



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VIRUS DE MARBURG: EPIDEMIOLOGIA, PATOGENECIDADE,
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E TERAPÊUTICA**

Trabalho submetido por
Beatriz Alves Costa Alegria
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VÍRUS DE MARBURG: EPIDEMIOLOGIA, PATOGENECIDADE, DIAGNÓSTICO LABORATORIAL E TERAPÊUTICA

Trabalho submetido por
Beatriz Alves Costa Alegria
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Nuno Eduardo Moura dos Santos da Costa Taveira

Setembro de 2016

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Taveira, pela disponibilidade e orientação cruciais para a concretização desta monografia.

A todos os docentes que partilharam o seu conhecimento na esperança de tornar os farmacêuticos de amanhã excelentes profissionais. Espero que essa esperança se torne realidade.

À minha companheira e animadora de dias de escrita sem fim, Beatriz, um grande obrigada! Entre momentos sérios também fazem falta gargalhadas e não tenhas dúvida que estas páginas infinitas se tornaram reais com a tua ajuda.

À Diana, pelas conversas sem sentido no meio da falta de palavras por tantas linhas já escritas.

À Amélia, pela paciência de me aturar três meses ao balcão e ouvir todos os meus disparates, sempre pronta a pôr-me os pés no chão. Obrigada por um estágio repleto de conhecimento e pela força para seguir os meus sonhos. A todos os restantes membros da equipa da Farmácia Central de Almada que mesmo através do mais pequeno conhecimento transmitido contribuíram para a profissional que espero me tornar.

Aos meus avós Sérgio e Cila, pelas sempre prontas palavras de força.

À minha avó Adília, por me dar tanto carinho e me fazer sentir sempre segura. E claro, por me manter sempre hidratada.

Ao meu padasto Toni, um enorme obrigada por acreditar nas minhas capacidades e pelo apoio que sempre me deu e continua a dar.

À minha mãe, pela fé que deposita em mim. Por me atender o telefone dez vezes e no dia seguinte continuar a fazê-lo. Haja paciência.

Ao meu pai, pelos sacrifícios que fez por mim na certeza de que este dia ia chegar. Obrigada pelas palavras de sabedoria, pelos infindáveis conselhos, por se rir de mim quando encaro um problema como o fim do mundo e me ajudar a perceber que há sempre uma volta por cima independentemente da “calamidade”.

Resumo

O vírus de Marburg é um dos agentes etiológicos das febres hemorrágicas virais e o primeiro membro da família Filoviridae, da qual também faz parte o vírus Ébola. Apesar de não tão mediático, o vírus de Marburg já provocou um total de 12 casos/ surtos desde que foi identificado em 1967, e pela sua patogenicidade e potencial como arma biológica é alvo constante de estudos com o objetivo de alargar o conhecimento sobre o mesmo e desenvolver medidas de tratamento, controlo e prevenção. Atualmente, a doença de Marburg não possui tratamento ou meio de imunização e continua a ser uma ameaça na região subsariana de África.

Neste trabalho revê-se o conhecimento atual sobre o vírus e a doença de Marburg no que concerne à epidemiologia, patogénese, diagnóstico, tratamento, controlo e prevenção. Para esta revisão consultou-se as seguintes bases de dados: PubMed, Science Direct e SciELO; Foram lidos e analisados cerca de 142 artigos publicados entre os anos 1971 e 2016.

Palavras-chave: vírus de Marburg, doença de Marburg, epidemiologia, patogenicidade, diagnóstico laboratorial, terapêutica

Abstract

Marburg virus is one of the etiologic agents of viral hemorrhagic fevers and the first member of the Filoviridae family, in which is also included the Ebola virus. Although Marburg virus is not as mediatic, it has already caused 12 cases/ outbreaks since its identification in 1967, and its pathogenicity and potential as a biological weapon make it a constant target for studies, in the hope of extending the current knowledge and developing treatment, control and prevention strategies. Currently, Marburg virus disease does not have a treatment or vaccination and continues to represent a threat to the African sub-Saharan region.

In this paper is exposed the present knowledge about the epidemiology, pathogenicity, diagnosis, treatment, control and prevention. To the substantiation of this review, the following databases were consulted: PubMed, Science Direct e SciELO; About 142 papers from 1971 to 2016 were read and analyzed.

Keywords: Marburg virus, Marburg virus disease, epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment

Índice

Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas e Acrónimos	9
Características Gerais dos Filovírus	13
Família Filoviridae	13
Estrutura e Replicação dos Filovirus	16
Género <i>Marburgvirus</i>	17
Género <i>Ebolavirus</i>	18
Género <i>Cuevavirus</i>	19
Classificação Molecular e Estrutura Viral do Vírus de Marburg.....	21
Proteína GP 1,2	23
Proteína NP	24
Proteína VP40	25
Proteína VP35	26
Proteína VP30	27
Proteína L.....	27
Proteína VP24	27
Ciclo de Replicação	28
Epidemiologia.....	31
Origem e distribuição geográfica dos surtos de infeção por MARV	31
Ocorrências de infeção por MARV	31
Transmissão	37
Reservatório Animal.....	38
Patogénese	41
Manifestações Clínicas.....	45
Diagnóstico Laboratorial	49

Nível de Segurança.....	50
Terapêutica	53
Desenvolvimento de novas terapêuticas	53
Prevenção e Controle	57
Desenvolvimento de vacinas.....	60
Considerações Finais	64
Referências Bibliográficas	65

Índice de Figuras

Figura 1 – Organização esquemática da família Filoviridae	13
Figura 2 – Representação gráfica da estrutura dos filovírus.	16
Figura 3 - Organização esquemática do genoma do vírus de Marburg.	21
Figura 4 – Organização esquemática do virião do vírus de Marburg.	22
Figura 5 – Imagem do vírus de Marburg por microscopia eletrónica.....	23
Figura 6 – Representação esquemática do ciclo de replicação do MARV.	29
Figura 7 – Distribuição geográfica da localização dos surtos de MARV.	33
Figura 8 – Esquema de transmissão do vírus de Marburg.	38
Figura 9 – Morcego da espécie <i>Rousettus aegyptiacus</i> , reservatório animal do vírus de Marburg.....	39
Figura 10 – Cronologia da sintomatologia associada à doença de Marburg.....	45
Figura 11 – Lesões dermatológicas em indivíduo com doença de Marburg.....	46
Figura 12 – Exantema maculopapular em indivíduo com doença de Marburg.....	47
Figura 13 – Hiperémia conjuntival em indivíduo com doença de Marburg	47
Figura 14 – Suporte visual utilizado para educar a população em regiões de surtos.	58
Figura 15 – Esquema da estratégia de prevenção e controlo de surtos de Ébola e Marburg, segundo a Organização Mundial de Saúde.	60

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resumo das características dos vírus da família Filoviridae	14
Tabela 2 – Histórico de surtos e casos de MARV desde a sua identificação em 1967 até 2016.....	35

Lista de Abreviaturas e Acrónimos

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ALT	Alanina Aminotransferase
ARE	<i>Antioxidant Responsive Elements</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensageiro
AST	Aspartato Aminotransferase
BDBV	Vírus Bundibugyo
BSL	<i>Biosafety Level</i>
CAdVax	Vacina de Adenovírus Complexo
CCL	<i>(C-C motif) ligand</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CXCL1	<i>(C-X-C motif) ligand 1</i>
DM	Doença de Marburg
dsARN	Ácido Ribonucleico de cadeia dupla
EBOV	Vírus Ébola
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
EUA	Estados Unidos da América
eVP40	Proteína VP40 do vírus Ebola
FHCC	Febre Hemorrágica de Crimeia-Congo
FHSR	Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
FHV	Febre Hemorrágica Viral
IFN	Interferão
IL	Interleucina
IL-1RA	<i>Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>

ISG	<i>IFN Stimulated Gene</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KEAP1	<i>Kelch-Like ECH-Associated Protein 1</i>
LLOV	Vírus Llovio
MARV	Vírus Marburg
ME	Microscopia Eletrônica
MLR	<i>Mucin-Like Region</i>
MPS	<i>Monocyte Phagocyte System</i>
mVP40	Proteína VP40 do vírus de Marburg
NPC1	<i>Niemann-Pick disease type C1</i>
NRF2	<i>Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões Moleculares Associados a Patogénios
QENP	Queen Elizabeth National Park
RAVV	Vírus Ravn
RESTV	Vírus Reston
RLR	<i>RIG-I-Like Receptor</i>
rNAPC2	Proteína Anticoagulante c2 de Nematode Recombinante
RRP	Recetores de Reconhecimento de Padrões
RT-LAMP	<i>Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
rVSV	Vacina Recombinante de Vírus da Estomatite Vesicular Atenuada
SPB	<i>Special Pathogens Branch</i>
SPHV	Síndrome Pulmonar por Hantavirus
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SUDV	Vírus Sudan
TAFV	Vírus Tai Forest

TNF	Fator de Necrose Tumoral
VEE	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VLP	<i>Virus-Like Particle</i>
VSPB	<i>Viral Special Pathogens Branch</i>

CAPÍTULO I

Características Gerais dos Filovírus

Família Filoviridae

A família Filoviridae é uma das quatro famílias que constituem a ordem Mononegavirales, e inclui três gêneros – *Marburgvirus*, *Ebolavirus* e o mais recentemente identificado, *Cuevavirus* – com um total de oito vírus de elevada virulência (Figura 1) (Kuhn et al., 2014; Martina & Osterhaus, 2009; Rougeron, Feldmann, Grard, Becker, & Leroy, 2015; Saphire, 2013). Todos os vírus desta família são genômica e morfológicamente idênticos e diferenciam-se das restantes famílias da ordem Mononegavirales – Rhabdoviridae, Paramyxoviridae, Bornaviridae – não só pelo genoma de ARN não segmentado e particularmente longo, mas também pela morfologia filamentosa e com configurações singulares. Outras das características particulares dos filovírus é a infeção restrita de mamíferos, a presença de uma proteína (VP24) exclusiva da família, e codões de iniciação e terminação da transcrição singulares (Kuhn et al., 2010).

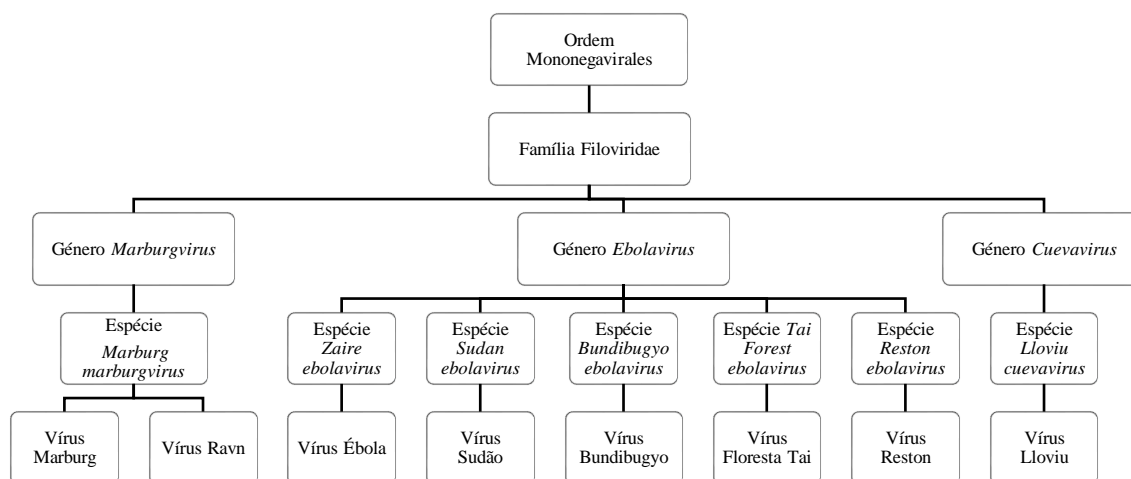


Figura 1 – Organização esquemática da família Filoviridae (Kuhn et al., 2010)

Outra singularidade do genoma dos filovírus, relativamente às famílias homólogas, são as sobreposições de genes e uma fase de leitura aberta que codifica a proteína VP24, inexistente nos restantes mononegavírus (Kuhn et al., 2010). Na tabela 1 encontram-se as características do virião e genoma dos vírus da família Filoviridae.

Tabela 1 – Resumo das características dos vírus da família Filoviridae (H. Feldmann, Slenczka, & Klenk, 1996; Martina & Osterhaus, 2009; Pan American Health Organization, 2003; Rougeron et al., 2015; Saphire, 2013)

Família Filoviridae		
Virião	Largura	80 nm
	Comprimento	1 – 14 µm
	Peso	4,5 × 10 ⁶ kDa
	Invólucro	Sim
	Forma	Filamentosa
	Configuração	‘U’, círculo ou ‘6’ (Figura 2)
Genoma	Ácido nucleico	ARN
	Estrutura	Cadeia simples linear, não segmentado
	Polaridade	(-)
	Tamanho	≈ 19 kb
	Morfologia da cápside	Helicoidal
	Genes	NP, VP30, VP24, VP40, VP35, L e GP

Trata-se de vírus zoonóticos – transmissíveis ao homem através de animais vertebrados –, no entanto, até à data, ainda não há certeza sobre o animal reservatório destes géneros, apenas suspeita de algumas espécies de morcegos. Os filovírus são facilmente transmitidos, através de contato direto com fluidos corporais, como sangue, urina e suor entre outros (Martina & Osterhaus, 2009).

Os filovirus têm um período de incubação no homem de 2 a 14 dias, após o qual rapidamente aumentam a carga viral, sendo que, em média, a morte acontece no décimo sexto dia após início da sintomatologia (Saphire, 2013). A infeção por esta família resulta em Febre Hemorrágica Viral (FHV) e os surtos, normalmente ocorrentes na África subsariana, estão associados a taxas de mortalidade de 90%, tomando uma dimensão assustadora por advirem de vírus sem qualquer opção de imunização ou tratamento específico após infeção (Bausch et al., 2007; Bausch, Sprecher, Jeffs, & Boumandouki, 2008; Martina & Osterhaus, 2009; Moyon et al., 2015; Warren, Warfield, Wells, Swenson, et al., 2010).

A FHV é uma doença provocada por um leque de vírus altamente patogénicos em que o indivíduo afetado desenvolve uma síndrome de falha multiorgânica com hemorragias graves generalizadas. Este termo não só define geralmente a doença provocada pelos filovírus, mas também por outros vírus patogénicos que também têm a capacidade de provocar hemorragias graves em indivíduos infetados, todos referidos na lista da Special Pathogens Branch (SPB). Incluídos estão o vírus Ébola, vírus da febre do vale do Rift, vírus da encefalite da carraça, vírus da febre de Lassa, vírus Nipah, vírus Hendra, vírus da febre hemorrágica de Crimeia-Congo (FHCC), vírus da coriomeningite linfocitária, vírus de Alkhurma, vírus da doença da floresta de Kyasanur, vírus da febre hemorrágica de Omsk, vírus de Chapare, vírus Lujo, Hantavírus causador de febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) e de síndrome pulmonar (SPHV) (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). Os primeiros sinais de FHV são mais abruptos quando se tratam de infeções por EBOV, MARV e FHCC – agente etiológico da febre hemorrágica de Crimeia-Congo, uma zoonose viral com taxas de mortalidade por volta dos 50%, pertencente à família Bunyaviridae –, no entanto, durante as primeiras semanas o doente pode não aparentar a doença fisicamente. (Chinikar et al., 2009; Fhogartaigh & Aarons, 2015)

Devido à elevada patogenicidade, à fácil disseminação e à elevada taxa de mortalidade associados aos seus surtos, todos os filovírus têm elevado potencial como arma biológica. Estes estão classificados como agentes de bioterrorismo de categoria A pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (U.S. Department of Health and Human Services – HHS) e o seu manuseamento em laboratório está restrito a instalações de nível 4 de biossegurança (BSL-4) (Lin et al., 2015; Piercy, Smither, Steward, Eastaugh, & Lever, 2010; Sarwar, Sitar, & Ledgerwood, 2010).

Não só os filovírus, mas também todos os agentes etiológicos de FHV estão ao abrigo de um programa de estudo e monitorização criado pelo Centro de Controlo de Doenças e Prevenção (CDC) – agência do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos que se foca em doenças infecciosas e de outras etiologias, saúde ocupacional, saúde ambiental, promoção da saúde e prevenção, entre outros –, o Viral Special Pathogens Branch (VSPB). O VSPB tem vários objetivos como a assistência a epidemias, estudos epidemiológicos para deteção, prevenção e controlo de patogénicos, investigação a nível da patogenicidade, fisiopatologia, tratamento e cura de tais infeções. Também atua como consultora de investigações nacionais e internacionais no seu âmbito, colabora com a

OMS como centro de referência para investigação de febres hemorrágicas virais. Tem ainda um papel importante na educação e informação do público (Centers for Disease Control and Prevention, 2013; Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging Zoonotic Infectious Diseases, & Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, 2013).

Estrutura e Replicação dos Filovírus

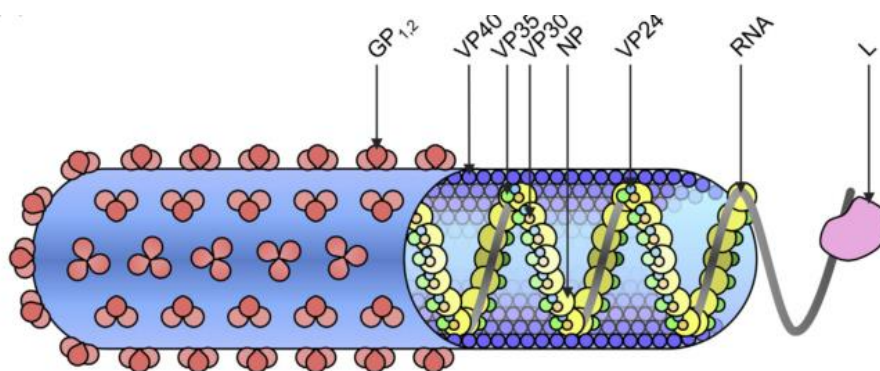


Figura 2 – Representação gráfica da estrutura dos filovírus (adaptado de (Banadyga, Dolan, & Ebihara, 2016)) Todos os vírus da família Filoviridae têm em comum a morfologia e a constituição proteica. Tratam-se de vírus com forma U, círculo ou “6” (como demonstrado na figura) e genoma de ARN com nucleocápside helicoidal. As proteínas NP, L, VP30 e VP35 constituem o complexo da nucleocápside, a VP40 e VP24 são proteínas de matriz e a GP é a proteína de superfície pertencente ao invólucro viral.

O genoma de ARN possui sete genes que se encontram separados por regiões intragênicas não traduzidas. A nucleocápside é constituída pelas proteínas estruturais NP, VP30, L e VP35. A matriz que envolve a nucleocápside é formada pelas proteínas VP24 e VP40, interligando-a ao invólucro (Figura 2). O invólucro é essencialmente constituído por glicoproteínas na sua superfície, as proteínas virais (GP) que formam espículas com cerca de 7nm de comprimento, intervaladas entre si por 10nm, inserindo-se na camada bilipídica que tem origem na membrana citoplasmática celular. O invólucro é essencial para ligação do virião à célula hospedeira e posterior entrada do vírus na célula (Albariño et al., 2015; H Feldmann, Klenk, & Sanchez, 1993; Kiley, 1988).

A replicação dos Filovírus é iniciada pela ligação do invólucro viral à célula hospedeira, por meio da interação da proteína GP com recetores e coreceptores da membrana da célula

hospedeira, resultando na entrada do vírus por endocitose. Após a entrada do vírus na célula hospedeira, ocorre a fusão do invólucro viral com a membrana endossomal que desencadeia a libertação das proteínas e genoma virais para o citoplasma da célula onde se realiza a replicação do vírus propriamente dita. A transcrição da molécula de ARN viral é feita pelo complexo VP35 e L (Takada, 2012).

São produzidas, a partir do genoma viral, cópias de ARN viral positivas que posteriormente servirão de molde para a síntese da molécula de ARN viral final com polaridade negativa. Simultaneamente, na membrana citoplasmática da célula hospedeira, as moléculas completas de ARN viral, já encapsuladas pelas proteínas NP e VP30, são ligadas às proteínas VP40 e GP, sendo de seguida incorporadas em partículas virais (Takada, 2012).

Género *Marburgvirus*

O género *Marburgvirus*, foco desta revisão, foi identificado em 1967 e inclui uma única espécie denominada *Marburg marburgvirus* (previamente conhecida como *Lake Victoria Marburgvirus*) com duas variantes identificadas, o vírus de Marburg (MARV) e o vírus Ravn (RAVV) (Kuhn et al., 2014).

O MARV, também referido como vírus de Marburg, é o foco desta revisão sendo que será discutido mais à frente em pormenor.

O Ravn vírus foi identificado em 1987 no Quénia, após um adolescente de 15 anos de nacionalidade dinamarquesa ter demonstrado sintomatologia característica da infeção por MARV. O adolescente acabou por falecer 10 dias depois após terem sido tomadas as medidas disponíveis (Bausch et al., 2006; Tukei, 1988). A origem da infeção ficou por determinar com certeza.

Depois disso apenas reemergiu em 1999 em Durba (República Democrática do Congo), com um caso identificado no meio de um surto de MARV (Bausch et al., 2006). Em 2007, foi identificado mais um caso de infeção por RAVV no Uganda, com origem em uma mina de chumbo (Adjemian et al., 2011; Towner et al., 2009).

O RAVV já foi isolado a partir de morcegos *Rousettus aegyptiacus* oriundos de cavernas no Uganda, o que sugere que esta espécie possa ser um reservatório natural dos *Marburgvirus*. No entanto não há ainda confirmação quanto ao reservatório do RAVV,

bem como os meios de transmissão para humanos (Wahl-Jensen et al., 2013). Outro ponto crucial que fica ainda por definir na caracterização deste vírus é o seu período de incubação (Johnson et al., 1996).

As manifestações clínicas da infecção por RAVV assemelham-se às da infecção por MARV: cefaleias, febre, prostração, vômitos, náuseas e anorexia seguidas de hematoquesia, hipotensão equimoses, leucocitose e trombocitopenia. Em uma fase mais avançada do quadro clínico aparecem delírios, cianose, hipotensão severa, febre elevada, alteração da cascata de coagulação, choque hipovolêmico e consequentemente morte. Resultados de autópsia revelaram hemorragias ao nível das mucosas conjuntivas e gastrointestinais, pulmões, traqueia, córtex renal, bexiga e epicárdio, juntamente com edema retroperitoneal e efusões na pleura, pericárdio e peritônio (Johnson et al., 1996)

Género *Ebolavirus*

O género *Ebolavirus* foi o segundo a ser identificado, depois do *Marburgvirus*, no ano de 1976, após dois surtos simultâneos no Zaire (atualmente denominado República Democrática do Congo) e Sudão. A origem da infecção no Zaire começou numa pequena vila e rapidamente foram detetados múltiplos casos por todo o país, resultando do surto 318 casos reportados com uma taxa de mortalidade de 89% (Kuhn et al., 2014; Le Guenno et al., 1995). No mesmo espaço de tempo no Sudão, o número de casos alcançou os 284, 53% dos quais resultaram em morte (Le Guenno et al., 1995). O novo vírus foi denominado de Ébola por ser o nome do rio onde foi identificado, localizado a norte da República Democrática do Congo, sendo este incluído na espécie *Zaire ebolavirus* (Fauci, 2014).

Este é o género da família Filoviridae que mais espécies inclui. O vírus Ébola (EBOV) é o único membro da espécie *Zaire ebolavirus*. Foi identificado em 1976 e é definido como o mais virulento do género, com uma taxa de mortalidade de 90% (Kugelman et al., 2015; Takada, 2012). O vírus Sudan (SUDV) pertence à espécie *Sudan ebolavirus*. Este vírus foi identificado em 1976, num surto que inclui casos de SUDV e EBOV, e é o segundo vírus mais perigoso, com taxas de mortalidade a atingir os 50% (Jun et al., 2015; Kugelman et al., 2015). O vírus Bundibugyo (BDBV) pertence à espécie *Bundibugyo ebolavirus*, a mais recente do género, e foi identificado em 2007 no Uganda. É o terceiro vírus do género mais letal, com taxas de mortalidade na ordem dos 40% (Kugelman et

al., 2015; Kuhn et al., 2014; Towner et al., 2008). O vírus Tai Forest (TAFV), da espécie *Tai Forest ebolavirus*, foi identificado em 1994 na Costa do Marfim, após uma etóloga ter sido infetada através da realização de uma autópsia a um cadáver de chimpanzé. Este vírus está associado apenas a dois casos de infeção e de nenhum deles resultou a morte do indivíduo (Geisbert & Feldmann, 2011; Le Guenno et al., 1995; Takada, 2012). Finalmente, o vírus Reston (RESTV), da espécie *Reston ebolavirus*, foi identificado em 1989 nos EUA, a partir de macacos importados das Filipinas. Até à data, este foi o único vírus do género que não provocou doença em humanos e apenas foi isolado em primatas (M. E. Miranda et al., 1999; M. E. G. Miranda et al., 2002; Takada, 2012).

Os *Ebolavirus* são transmitidos através de um vetor que ainda permanece por confirmar. No entanto, sabe-se que após a infeção o vírus permanece no organismo de 2 a 21 dias em incubação, sendo que depois desse período a sintomatologia inicia-se. Quanto às manifestações clínicas, variam com a espécie mas geralmente são caracterizados por um síndrome gripal numa fase inicial, seguido de falha multiorgânica que se manifesta por prostração, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, dispneia, tosse, edema, cefaleias, desorientação, petéquias, equimoses, entre outros. Todas estas patologias podem conduzir ao coma, sépsis e eventualmente, à morte. Por as manifestações clínicas serem maioritariamente comuns a todas espécies, a identificação do vírus não pode ser feita apenas pela observação de sintomatologia (Feldman & Geisbert, 2011).

A infeção por *Ebolavirus* não tem tratamento específico. A intervenção médica passa pelo isolamento dos doentes e cuidados médicos direcionados à sintomatologia, sendo que o resultado do tratamento está muito dependente do diagnóstico rápido (Khan et al., 1999; Tomori et al., 1999).

Género *Cuevavirus*

O *Cuevavirus* é o género mais recente da família Filoviridae e inclui, até à data, o vírus Lloviu (LLOV) da espécie *Lloviu cuevavirus* com um vírus integrante. A sua identificação foi feita em 2002 em Espanha, não tendo origem em África, pelo que é o primeiro filovírus em que tal acontece (Kuhn et al., 2014; Negro et al., 2011; Ng et al., 2014; Rougeron et al., 2015).

Este novo vírus foi incluído nos filovírus pela sua estrutura genómica que é característica dos restantes. Possui genoma de ARN cadeia simples linear de 19kb de comprimento com as setes proteínas também integrantes dos *Ebolavirus* e *Marburgvirus*, L, GP, NP, VP35, VP40, VP30 e VP24. A diferença a nível genómico reside nas proteínas VP24 e L que nos Cuevavírus são ambas expressas por um único gene, enquanto nos restantes filovírus cada proteína possui um único gene codificante (Negredo et al., 2011).

O LLOV assemelha-se mais ao género *Ebolavirus* e até que partilham a mesma origem (Maruyama et al., 2014). O seu genoma difere do vírus Marburg (variante Musoke) em cerca de 50% (Negredo et al., 2011).

A família Filoviridae tem sido largamente detetada em morcegos e, até à identificação do LLOV era considerada avirulenta. Contudo o vírus LLOV causa infeções letais para os morcegos da espécie *Miniopterus schreibersii*, que se pensa ser o reservatório deste vírus (Negredo et al., 2011; Rougeron et al., 2015).

Até à data ainda nenhum caso de infeção por LLOV em humanos foi reportado pelo que ainda não se sabe com certeza se este novo vírus é patogénico em humanos ou primatas (Albariño et al., 2015).

CAPÍTULO II

Classificação Molecular e Estrutura Viral do Vírus de Marburg

Trata-se de um vírus com invólucro, que cobre toda a cápside, diâmetro uniforme de aproximadamente 80nm, comprimento médio de 740nm e $4,2 \times 10^6$ kDa de peso molecular. O virião pode adquirir a forma de 'U', '6' ou de um cajado (Figura 5) (Kolesnikova, Muhlberger, Ryabchikova, & Becker, 2000; Muhlberger et al., 1992; Wijesinghe & Stahelin, 2016). O genoma de ARN não segmentado é de cadeia simples e polaridade negativa, sendo um vírus de classe V segundo a classificação de Baltimore (Baltimore, 1971). O genoma do MARV tem comprimento médio de 19.1 kb e contém sete genes que codificam para sete proteínas estruturais (Figura 3) (Heinz Feldmann et al., 1992; Kolesnikova et al., 2000; Muhlberger et al., 1992).

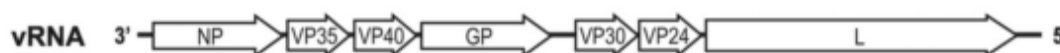


Figura 3 - Organização esquemática do genoma do vírus de Marburg (retirado de (Albariño et al., 2015)). Genoma de ARN com sete genes, NP, VP35, VP40, GP, VP30, VP24 e L, codificantes das respectivas proteínas estruturais.

As proteínas codificadas pelo genoma viral do MARV são semelhantes às dos restantes filovírus. O genoma viral possui genes que codificam para sete proteínas incluindo a nucleoproteína (NP) que forma um polímero e se associa ao ARN viral adotando uma forma helicoidal (Figura 4). Associado a este complexo ribonucleoproteico, também designado de nucleocápside, está a proteína L, uma polimerase do ARN ARN-dependente, bem como a proteína VP35, cofator da polimerase e a proteína VP30, ativadora da transcrição. A inclusão do genoma viral num complexo ribonucleoproteico favorece a sua proteção contra a degradação enzimática e detecção por parte de recetores de reconhecimento de padrões (RRPs), proteínas do sistema imunitário do hospedeiro responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Muhlberger, Tfering, Klenk, & Becker, 1998; Thompson, Kaminski, Kurt-Jones, & Fitzgerald, 2011; Wenigenrath, Kolesnikova, Hoenen, Mittler, & Becker, 2010).

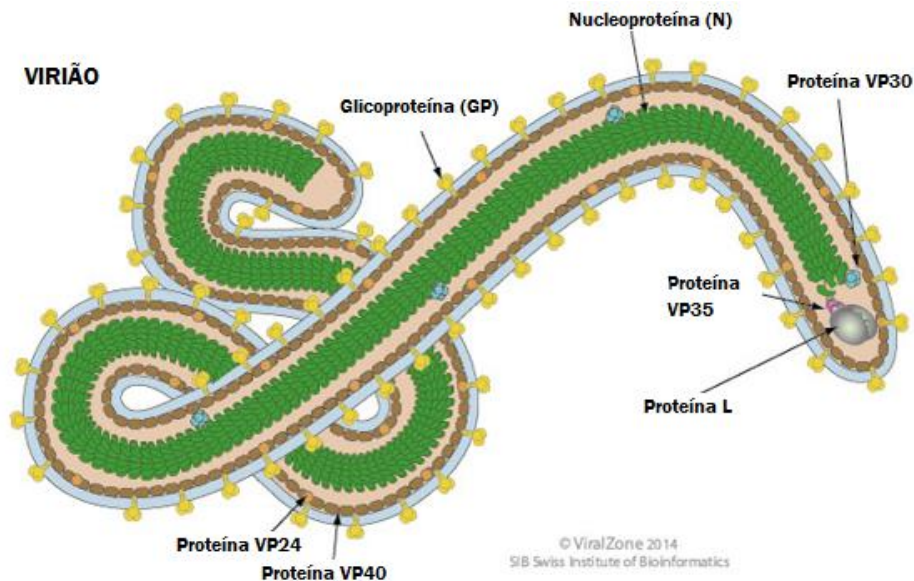


Figura 4 – Organização esquemática do virião do vírus de Marburg (retirado de <http://flipper.diff.org/app/items/6734>) O virião do MARV é constituído por sete proteínas estruturais: as proteínas N, L, VP30 e VP35 que integram o complexo proteico da nucleocápside viral, de forma helicoidal; as proteínas de matriz VP24 e VP40, situadas entre a nucleocápside e o invólucro; e a proteína GP, única proteína do invólucro presente na superfície do virião.

O complexo ribonucleoproteico está rodeado por uma matriz constituída pelas proteínas VP40 (proteína maior) e VP24 (menor). A VP40 participa na libertação do vírus para fora das células e antagoniza o interferão. A VP24 é responsável pela maturação da nucleocápside e também participa na libertação viral. Rodeando esta partícula existe um invólucro de natureza glucídica-lipídico-proteica constituído por uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira e pela glicoproteína GP1,2, que forma espículas de 7-10 nm que se projetam para o exterior do invólucro. A GP1,2 medeia a ligação do vírus aos recetores celulares, indispensável para a entrada do vírus nas células (Koehler et al., 2016; Warren et al., 2016).

Cada um dos sete genes tem presente um sinal de iniciação de transcrição e um sinal de terminação, e entre eles uma fase de leitura aberta compreendida entre regiões 3' e 5' não traduzidas. Os genes podem estar separados por regiões intergénicas ou pelos sinais de iniciação ou terminação do gene posterior ou anterior, respetivamente. Estas junções de genes podem estar sobrepostas em algumas regiões e são uma característica de todos os filovírus (Mühlberger, 2007).

Existe ainda informação insuficiente sobre as proteínas do MARV e as suas interações e funções, quando comparado com outros vírus que estão exaustivamente estudados. A importância do estudo das proteínas estruturais reside no facto de representarem um potencial alvo ou meio de ação da terapêutica, uma vez que são intervenientes cruciais em todos os processos de infeção viral. Apresento de seguida o que se constatou até à data sobre as proteínas estruturais do vírus de Marburg.

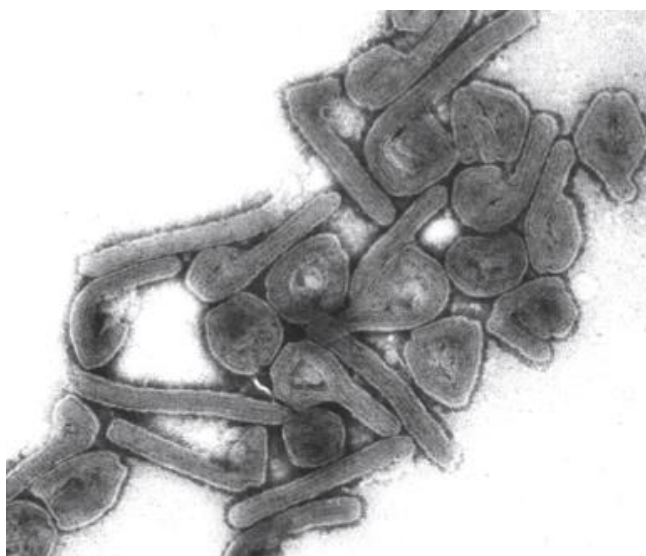


Figura 5 – Imagem do vírus de Marburg por microscopia eletrónica (retirado de <https://publichealthwatch.wordpress.com/2014/10/07/man-dies-from-ebola-like-marburg-virus-in-uganda/>)

Proteína GP 1,2

A proteína GP é a única proteína de superfície e está localizada no invólucro do vírus, tendo a responsabilidade de estabelecer o primeiro contato com a célula hospedeira, mediando a ligação e fusão viral (Wijesinghe & Stahelin, 2016; Will et al., 1993). É produzida a partir do gene *GP* numa poliproteína, fortemente modificada por glicosilação, acetilação e fosforilação durante a passagem no retículo endoplasmático e de seguida clivada no *trans Golgi network* pela furina, ou outra protease do tipo furina, no aminoácido 435. Deste processo resultam duas subunidades, GP1 e GP2, ligadas por uma ponte dissulfureto (Becker, Klenk, & Muhlberger, 1996; H. Feldmann, Will, Schikore, Slenczka, & Klenk, 1991; Funke, Becker, Dartsch, Klenk, & Muhlberger, 1995; Sängner, Mühlberger, Lötfering, Klenk, & Becker, 2002).

A subunidade GP1, que é maioritariamente extracitoplasmática, é a mediadora da ligação ao recetor da célula hospedeira. O principal recetor do vírus de Marburg e também do vírus Ébola parece ser a proteína membranária NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1) cuja principal função é ser um transportador do colesterol nos mamíferos (Carette et al., 2012).

A subunidade GP2 possui um péptido de fusão na sua porção extracelular e é responsável pela fusão das membranas viral e celular. A subunidade GP2 dos filovírus possui um domínio imunossupressor capaz de induzir a morte de linfócitos e neutraliza a função das citocinas. Não se sabe ainda se este domínio imunossupressor existe na GP2 do MARV (Koellhoffer et al., 2012; Yaddanapudi et al., 2006).

Após identificação do alvo viral, a proteína GP liga-se aos recetores e coreceptores de membrana da célula, desencadeando o processo de entrada do vírus por endocitose. A adesão à célula é mediada por uma região específica da proteína GP1,2, a *mucin-like region* (MLR), localizada no seu terço médio (Wijesinghe & Stahelin, 2016). Esta região é comum a todos os filovírus mas a sua estrutura é variável, o que leva a crer que a sua função não seja transversal a toda a família *Filoviridae* (Maruyama et al., 2014; Saphire, 2013). Pensa-se ainda que a proteína GP2 tenha um papel importante na antagonização da teterina, uma proteína antiviral ativada por meio do interferão que bloqueia a libertação de vírus da célula (Jouvenet et al., 2009).

Proteína NP

A nucleoproteína NP é codificada pelo gene NP e é a proteína que envolve o genoma, fazendo parte da nucleocápside viral. Esta desempenha um papel crucial na forma helicoidal característica deste vírus (Kolesnikova et al., 2000). A proteína NP é capaz de formar estruturas tubulares helicoidais *in vitro*, na ausência de todas as outras proteínas intervenientes e de genoma viral, cimentando a sua importância. Sabe-se também que os seus 390 resíduos N-terminais bastam para se formar a estrutura helicoidal da nucleocápside (Bharat et al., 2011; Kolesnikova et al., 2000).

Não só esta proteína é o centro da formação e estrutura da nucleocápside, como também é a principal proteína viral, pois forma ligações com todas as restantes, desempenhando papéis importantes em cada interação (Ver (Becker, Rinne, Hofsäss, Klenk, &

Mühlberger, 1998)). Através da sua ligação às proteínas VP35, VP30 e VP24, direcionadas para os corpos de inclusão¹ formados no citoplasma da célula (Bamberg, Kolesnikova, Möller, Klenk, & Becker, 2005). Outra interação da NP realiza-se com a matriz (VP40), facilitando o transporte de nucleocápsides para a membrana plasmática, após a sua formação (Dolnik, Kolesnikova, & Becker, 2008; Dolnik et al., 2010).

A proteína NP é fosforilada nos resíduos de serina e treonina agrupados em sete regiões da extremidade COOH, e só após fosforilação é incluída nos viriões. Acredita-se que a fosforilação da NP tem também um papel importante na transcrição viral (Dicarlo, Biedenkopf, Hartlieb, Klußmeier, & Becker, 2011).

Proteína VP40

A proteína da matriz VP40 é a maior proteína do virião e sustém todo o invólucro viral. É dotada de variados papéis importantes na invasão e replicação viral. Esta proteína é codificada pelo terceiro gene do genoma do MARV (gene com designação homóloga) (Dolnik et al., 2008; Koehler et al., 2016).

A mVP40 (proteína VP40 do MARV) difere da eVP40 (proteína VP40 do EBOV) em 66% dos aminoácidos (Koehler et al., 2016; Wijesinghe & Stahelin, 2016).

As tirosinas existentes na região aminoterminal estão fosforiladas e esta é uma característica importante para que exerça a sua função de condução das nucleocápsides para os locais de libertação (Dicarlo et al., 2011). Possui ainda um motivo PPPY que se destaca pela capacidade de mediar o processo de libertação viral ao interagir com regiões do complexo *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (ESCRT) (Urata & Yasuda, 2010).

Por si só, em células de mamífero, a VP40 dá origem a *virus-like particles* (VLPs) que são quase indistinguíveis de viriões, o que é consistente com um papel importante ao nível da formação dos viriões (Wenigenrath et al., 2010; Wijesinghe & Stahelin, 2016).

Outra função que é desempenhada pela VP40 é a inibição da resposta imunitária do hospedeiro por inibição da sinalização do IFN através do bloqueio do mecanismo de sinalização JAK-STAT. A VP40 é capaz de bloquear a fosforilação das cinases JAK, que

¹ Corpo de inclusão – Agregados de proteínas virais presentes no citoplasma ou núcleo da célula hospedeira, que se formam em locais de replicação viral

ativam as proteínas STAT1 e STAT2, e assim desencadeiam a expressão de genes estimulados pelo IFN (ISGs) que ativam moléculas antivirais capazes de regular o processo de sinalização do IFN (Schoggins, 2014; Valmas et al., 2010).

Pensa-se que o alvo da VP40, relativamente à inibição imunitária, é a JAK1 embora ainda não esteja completamente definido o mecanismo (Valmas et al., 2010).

Proteína VP35

A proteína VP35 é codificada pelo segundo gene do MARV, com designação homóloga, e tem funções importantes na transcrição e replicação do genoma viral bem como na imunossupressão do hospedeiro (Xue, Zheng, Zhang, Cui, & Zhang, 2014).

A replicação viral necessita da presença do complexo proteico VP35-NP que promove a ligação da proteína L à nucleocápside a fim de se iniciar a replicação (Muhlberger et al., 1998).

A VP35 tem capacidade de impedir a sinalização do vírus por parte de PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos, conjuntos de moléculas produzidas pelos patógenos que alertam o sistema imunitário do hospedeiro da invasão, por identificação por parte dos recetores de reconhecimento de padrões (RRP), presentes em determinadas células –, sinalizadas pela presença de sequências de ARN de cadeia dupla (dsARN), produzidas durante a replicação do MARV. Como consequência não ocorre fosforilação dos IRF3 e IRF7, fatores de regulação do interferão que desencadeiam a sua resposta. Este facto está comprovado, pois uma mutação induzida nos recetores do dsARN reduziram as ligações por eles estabelecidas e consequentemente a atividade do IFN β foi potenciada (Albariño et al., 2015; Edwards et al., 2016; Ramanan et al., 2012; Xue et al., 2014).

Adicionalmente, através da inibição da sinalização do RLR (RIG-I-like receptor) esta proteína consegue impedir a maturação das células dendríticas e o seu consequente funcionamento (Bosio et al., 2003).

Proteína VP30

A proteína VP30 é codificada pelo quinto gene do MARV e faz parte do complexo proteico da nucleocápside, juntamente com as proteínas NP, L e VP35 (Becker et al., 1998).

Até à data sabe-se que esta proteína desempenha papéis na transcrição e replicação. Em experiências *in vitro* não demonstrou ser essencial, no entanto, num ensaio em que foi reduzida a expressão de VP30 verificou-se a diminuição de síntese proteica viral (Fowler et al., 2005; Wenigenrath et al., 2010).

Uma característica potencialmente importante desta proteína é a presença de um domínio desconhecido de C3H1-Zn, também presente na proteína homóloga (VP30) do EBOV. No EBOV este motivo é indispensável à transcrição, no entanto no MARV a função deste domínio ainda não foi identificada (Modrof, Becker, & Mühlberger, 2003).

Proteína L

A proteína L é codificada pelo sétimo gene do MARV, o gene L, tem um peso molecular de 267 kDa, e é uma ARN polimerase ARN-dependente com a função de catalisar a transcrição dos genes do vírus e replicação, a partir do ARN (Muhlberger et al., 1992; Volchkov et al., 1999). Juntamente com as proteínas VP35 e NP, forma um complexo ARN-dependente necessário para iniciar a transcrição e replicação. A proteína L é a componente maioritária deste complexo (Muhlberger et al., 1998).

Adicionalmente, a proteína L participa no *capping* da terminação 5' do ARN mensageiro viral, pois possui atividade como metiltransferase e guaniltransferase, que são enzimas catalisadoras (Messaoudi, Amarasinghe, & Basler, 2015).

Todos os vírus de classe V – vírus ARN de cadeia simples não segmentados – têm presente esta proteína. O estudo da proteína L levou a concluir que tem uma sequência de aminoácidos altamente conservada (Poch, Blumberg, Bougueleret, & Tordo, 1990).

Proteína VP24

A proteína VP24 é codificada pelo sexto gene do genoma viral do MARV e localiza-se então em várias regiões do virião, ligada à membrana celular da célula hospedeira,

distribuída pelo citoplasma, inserida em inclusões com nucleocápsides e também associada a nucleocápsides livres. (Bamberg et al., 2005; Brauburger, Hume, Muhlberger, & Olejnik, 2012)

Esta proteína tem um papel importante na libertação de partículas virais (VLPs) em cenário de infecção viral e suspeita-se que é também responsável pela maturação de nucleocápsides e mediação da sua ligação a recetores nas membranas plasmáticas (Bamberg et al., 2005)

Outra função da VP24 é a sua ligação à proteína KEAP1 (Kelch-like ECH-Associated Protein 1), impedindo que esta interaja com o NRF2 (Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-like 2) e promova a sua degradação. Assim sendo, ocorre a acumulação de NRF2 junto ao núcleo da célula hospedeira, consequente expressão de genes com elementos de resposta antioxidante (ARE), que promove a recuperação de células sob stress oxidativo. Esta ação da VP24 permite prolongar a sobrevivência de células infetadas e dar continuidade à replicação viral (Edwards et al., 2014).

Ciclo de Replicação

A entrada do MARV na célula hospedeira inicia-se com a ligação da proteína GP à proteína membrana NPC1, que tem o papel de mediadora do processo de entrada. Existem estudos que põem a hipótese de outro tipo de recetores facilitarem a entrada do MARV nas células, como lectinas do tipo C, ou de pelo menos representarem um pequeno papel no processo, no entanto não há evidência e por isso não são referidas (Cara & Autelli, 2014; Matsuno et al., 2010). O MARV possui tropismo para uma vasta gama de células, como macrófagos, monócitos, células dendríticas, fibroblastos, células de Kupffer, hepatócitos, células endoteliais e epiteliais (Hartman, Towner, & Nichol, 2010; Hensley et al., 2011).

Na figura 6 está representado o processo de replicação viral na célula hospedeira. Após ligação da proteína GP ao recetor da célula hospedeira, o MARV desencadeia o processo de macropinocitose, um subtipo de endocitose, através do qual o vírus entra na célula pela formação de uma vesícula resultante da invaginação da membrana celular. Este processo é não seletivo e representa um mecanismo de entrada para vírus e outros patógenos (Lim & Gleeson, 2011). Ainda está por esclarecer o mecanismo exato de macropinocitose e as

moléculas do hospedeiro que nele participam, uma vez que os estudos realizados nesse sentido utilizaram uma forma alterada do MARV para que fosse possível o trabalho em laboratório de nível de segurança 2. As proteínas de membrana caveolina e clatrina mostraram resultados promissores como mediadoras mas estes resultados carecem ainda de confirmação (Bhattacharyya, Hope, & Young, 2011; Empig & Goldsmith, 2002).

Acredita-se que simultaneamente à endocitose do MARV, ocorra a clivagem da subunidade GP1 da proteína GP do invólucro, o que leva à exposição do seu domínio de ligação ao recetor NPC1, parte do processo de invasão viral (Chandran, Sullivan, Felbor, Whelan, & Cunningham, 2005).

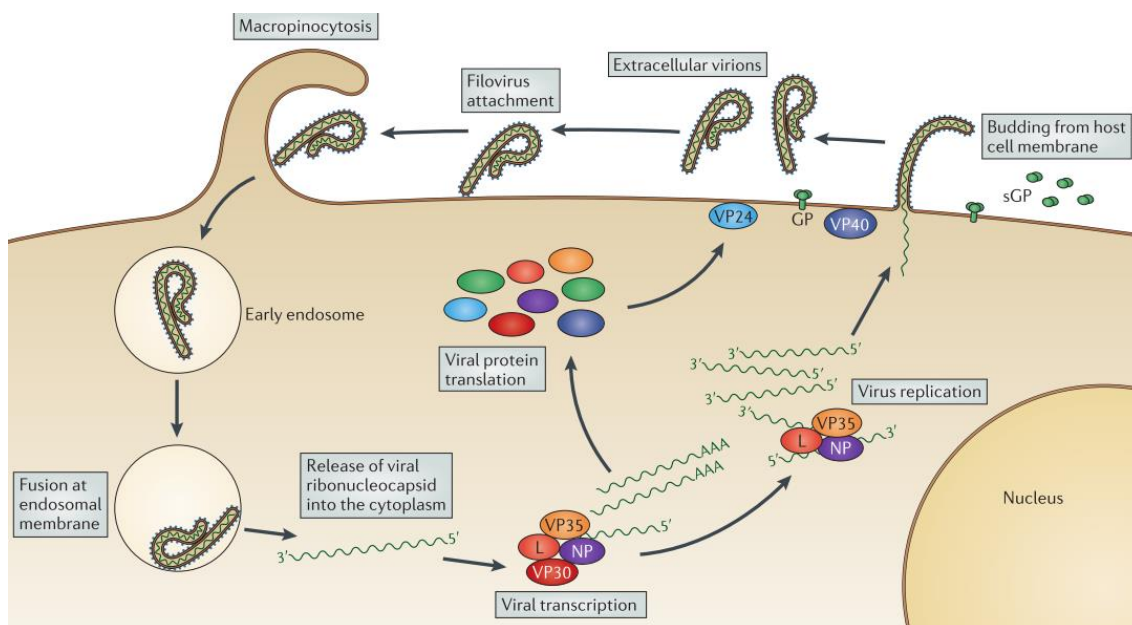


Figura 6 – Representação esquemática do ciclo de replicação do MARV (adaptado de (Messaoudi et al., 2015)) O processo de replicação inicia-se com a ligação da proteína GP do MARV à membrana da célula hospedeira e através de macropinocitose entra na célula no interior de um endossoma, onde a proteína GP é clivada pelas proteases celulares catpsina B e L. De seguida, a GP já clivada interage com a proteína NPC1 para se realizar a fusão das membranas viral e endossomal, com posterior libertação de ribonucleocápsides no citoplasma da célula. Já no citoplasma, o genoma de ARN viral é transcrito e depois replicado, originando sequências complementares que servirão de molde para síntese do genoma de polaridade negativa, na qual participam as proteínas NP, VP35 e L. Simultaneamente ocorre a tradução das proteínas virais. Os viriões são então montados na membrana plasmática, com incorporação das nucleocápsides contendo o genoma sintetizado, e das proteínas traduzidas, para serem libertados.

A fase final da entrada do MARV na célula hospedeira é a fusão, onde a subunidade GP2 da proteína GP desempenha o papel principal. Em meio ácido, a membrana desta subunidade sofre alterações e desencadeia a fusão do virião com as membranas endolisossomais, e a nucleocápside é libertada no citoplasma da célula (Koellhoffer et al., 2012).

Com a nucleocápside já no citoplasma, ocorre a descapsidação e a transcrição de genes é iniciada, com participação das proteínas NP, VP35 e L. Dela resultam sete ARNm que são posteriormente *capped* em 5' e poliadenilados em 3', de seguida traduzidos para as diferentes proteínas virais. O ARN genómico é replicado em ARN genómico de polaridade positiva que serve de molde para a síntese de novos genomas, que são encapsulados nas nucleocápsides dos novos viriões.

As nucleocápsides formadas são então transportadas até ao local de libertação na membrana, onde estão ancoradas as glicoproteínas GP. Este processo inicia-se quando a nucleocápside se associa à membrana plasmática da célula hospedeira, sendo envolvida por esta até se dar a libertação de viriões para o exterior da célula. Este processo é desencadeado pela proteína de matriz VP40, responsável por recrutar ao local as nucleocápsides, e a proteína GP, por meio do transporte vesicular COPII. E ainda por induzir a formação e libertação de viriões.

O processo de libertação de partículas virais, mediado pela proteína VP40, inicia-se com o alinhamento das nucleocápsides junto à membrana citoplasmática. A libertação de viriões é feita através de filopodia – protusões da membrana plasmática constituídas principalmente por actina, utilizadas por células para sondar o ambiente que as rodeia – que facilita o processo de libertação viral para outras células por mediação de contacto entre células feito pela própria filopodia, dependente da estrutura de actina. As nucleocápsides alinhadas inserem-se nas protusões da membrana plasmática e são libertadas para o exterior da célula (Kolesnikova, Bohil, Cheney, & Becker, 2007; Mattila & Lappalainen, 2008; Welsch et al., 2010)

A replicação e transcrição do MARV ainda carece de muito estudo e algumas das hipóteses são adaptadas de conclusões tiradas a partir de estudos do EBOV.

CAPÍTULO III

Epidemiologia

Origem e distribuição geográfica dos surtos de infecção por MARV

A origem das infecções humanas por MARV têm, até à data, sido restritas ao continente africano, mais precisamente à região subsariana (Zehender et al., 2016). Na figura 7 pode-se observar a distribuição geográfica dos surtos de MARV, desde a sua identificação em 1967, na Alemanha e Sérvia, até aos dias de hoje.

Uma análise filogenética a sequências genómicas de MARV isoladas ao longo dos anos concluiu que o MARV se divide em duas clades ² com diferença genética de aproximadamente 6%. Adicionalmente, o MARV parece apresentar padrões de surgimento de casos, como casos isolados a serem reportados anos antes de um surto, ou longa duração de epidemias (Zehender et al., 2016).

A maioria as sequências genómicas analisadas estão presentes na caverna Python e nas minas Kitaka (referidas mais a diante) suporta a afirmação de que o Uganda é o local de origem do vírus de Marburg (Zehender et al., 2016).

Outro estudo, este realizado com o objetivo de prever áreas de possível aparecimento de casos, com base em ocorrências anteriores e características ambientais das localizações, concluiu que adicionalmente às regiões já identificadas como endémicas para o vírus de Marburg, o sul da Etiópia, Tanzânia, Moçambique, Zâmbia e algumas zonas da África do Sul podem vir a ser locais de aparecimento de novos casos (Peterson & Samy, 2016).

Ocorrências de infecção por MARV

No ano de 1967 foi identificado o vírus de Marburg em 32 trabalhadores de laboratórios farmacêuticos, na Alemanha (Marburg e Frankfurt) e antiga Jugoslávia (Belgrado), que demonstraram sinais de febre e hemorragia interna, acabando por falecer sete dos trinta e dois infetados (Martina & Osterhaus, 2009). Concluiu-se que a relação entre todos os indivíduos afetados foi o contacto com sangue de macacos *Cercopithecus aethiops* importados do Uganda, e que revelaram resultados positivos para presença de ARN viral. A infecção dos indivíduos durante a realização de autópsias aos cadáveres dos macacos

² Clade – grupo de organismos com origem a partir de um ancestral comum e exclusivo

que estavam a ser utilizados no desenvolvimento e produção de vacinas contra a poliomielite. Após confirmação de que se tratava de um novo vírus, foi nomeado de vírus de Marburg por ter sido a cidade com maior número de casos reportados (Lin et al., 2015; Rougeron et al., 2015).

A primeira ocorrência de infecção por MARV a ser reportada após a sua identificação demorou oito anos e teve origem no Zimbabué. Desde então o MARV foi responsável por quatro surtos a somar a múltiplos casos isolados (Pigott et al., 2015; Rougeron et al., 2015). Em 1975, na África do Sul, foi descrito o segundo caso de infecção por MARV em dois turistas que durante a sua estadia visitaram as grutas Chinhoyi, no distrito Makonde, Zimbabué, onde possivelmente tiveram contato com morcegos. No total originou três casos, dois turistas e um profissional de saúde, e um dos indivíduos infetados acabou por falecer (Amman et al., 2012).

Em 1980, no Quénia, um homem deu entrada no hospital com sintomas do que depois se confirmou ser febre hemorrágica provocada pelo MARV e não resistiu à infecção. O médico que o assistiu foi infetado no decorrer da prestação de cuidados, no entanto conseguiu recuperar e a situação foi contida sem que houvesse mais casos. Pensa-se que a origem tenha sido nas grutas de Mt. Elgot, conhecidas pela grande população de morcegos de várias espécies (Amman et al., 2012; Smith et al., 1982).

Em 1998 surgiram novamente casos de infecção por MARV em Durba, República Democrática do Congo, num grupo de mineiros de uma mina de ouro e o surto alargou-se por contágio dos familiares e amigos. O surto durou dois anos a ser declarado extinto, no ano 2000. No total deu origem a 128 mortes de 154 casos reportados, com uma taxa de mortalidade de 83%. Durante o surto foram identificadas mais de nove estirpes do MARV em indivíduos infetados, o que sugere que o surto não foi iniciado a partir de um único foco pois é pouco provável que tenha sido atingido um nível de diferenciação genética tão avançado no espaço de tempo em questão (Bausch et al., 2006).

Até então o MARV era associado a taxas de mortalidade mais baixas que o EBOV e por isso as investigações eram maioritariamente dirigidas para o EBOV (Amman et al., 2012; Rougeron et al., 2015).



Figura 7 – Distribuição geográfica da localização dos surtos de MARV (adaptado de <http://www.cdc.gov/vhf/marburg/outbreaks/distribution-map.html>) Quênia, Uganda, República Democrática do Congo, Angola e África do Sul são os países onde, até 2014, ocorreram surtos provocados pelo vírus de Marburg. Neste mapa não se encontram representados os casos isolados.

O maior surto de MARV, até aos dias de hoje, ocorreu quatro anos depois, de 2004 a 2005 em Angola, com 329 mortes e taxa de mortalidade de 88%. Este surto foi associado a um estabelecimento de saúde em Uíge, no entanto a origem ficou até hoje por determinar

(Amman et al., 2012; Rougeron et al., 2015). Em análise aos vírus causadores deste surto, uma vez que as sequências virais presentes nas amostras recolhidas se revelaram altamente conservadas, foi possível concluir que o surto foi iniciado por um único indivíduo infectado que transmitiu o vírus a terceiros, desencadeando o surto (Bausch et al., 2006).

Entre 2007 e 2008 foram reportados 6 casos isolados de infecção por MARV no Uganda (Rougeron et al., 2015). Em Julho e Setembro de 2007, foram identificados novos casos de MARV em trabalhadores das minas de ouro de Kitaka. Quando analisada a população de morcegos, nomeadamente de *R. aegyptiacus*, foram identificadas 5 estirpes do vírus de Marburg, demonstrando a capacidade de coexistência de várias estirpes dos vírus numa mesma população e até entre a mesma espécie animal (Amman et al., 2012; Towner et al., 2009). Em Dezembro do mesmo ano, um turista americano visitou a gruta Python, localizada no Parque Nacional Rainha Isabel (QENP) no Uganda, e foi infectado pelo vírus. A sintomatologia apenas se revelou quando este já tinha regressado ao seu país, onde foi assistido e acabou por recuperar com sucesso (Amman et al., 2012).

Em Junho de 2008, ocorreu um novo caso de MARV também com origem na gruta Python, no Uganda. No seguimento da visita a esta gruta, um turista holandês foi infectado e acabou por falecer, sem contágio a terceiros. A gruta Python já foi extensivamente estudada por ter sido identificada como epicentro de múltiplos casos de infecção por MARV e ser conhecida a sua grande população de *R. aegyptiacus*. Numa investigação ao local de origem do surto, foi analisada a população de morcegos *R. aegyptiacus* da caverna Python, no Uganda, e foi confirmada a presença de anticorpos anti-MARV, ARN e genoma viral em ensaios ELISA, RT-PCR e isolamento viral, respetivamente (Amman et al., 2012).

O último surto datou de 2012 no Uganda, quando foram identificados 23 casos de infecção por MARV dos quais resultaram 15 mortes, com uma taxa de mortalidade de 65% (Rougeron et al., 2015).

A 6 de Outubro de 2014, o Ministério da Saúde do Uganda reportou um caso de MARV em que o indivíduo afetado acabou por falecer na sequência da infecção. No seguimento desta ocorrência, durante três semanas foram seguidos 197 indivíduos, identificados por terem estado em contacto com o indivíduo infectado, mas todos foram confirmados negativos para o vírus. A 13 de Novembro de 2014 o Ministério da Saúde do Uganda

declarou o caso isolado e a situação contida. Este foi o último caso de infecção por MARV (Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, & Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, 2014; Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, & Viral Special Pathogens Branch, 2014).

A tabela 2 resume o histórico de surtos e casos de MARV desde a sua identificação em 1967 até ao presente ano. O vírus de Marburg tem sido associado a menores taxas de mortalidade e menor número de surtos ou casos quando comparado com os vírus do género *Ebolavirus*, no entanto, analisando dados objetivos, os números tem diferido cada vez menos com o avançar dos anos (Polonsky et al., 2014; Rougeron et al., 2015).

Tabela 2 – Histórico de surtos e casos de MARV desde a sua identificação em 1967 até 2016

Ano	Localização	Origem	Número de infetados/ Taxa de mortalidade (%)	
1967	Marburg, Alemanha	Uganda	31 / 23	(Martina & Osterhaus, 2009)
	Frankfurt, Alemanha	Uganda		
	Belgrado, Sérvia	Uganda		
1975	África do Sul	Zimbábue	3 / 33	(Amman et al., 2012)
1980	Quénia	Quénia	2 / 50	(Amman et al., 2012)
1998-2000	DRC	DRC	154 / 83	(Bausch et al., 2006)
2004-2005	Angola	Angola	252 / 88	(Amman et al., 2012)
2007	Uganda	Uganda	4 / 25	(Rougeron et al., 2015)
2008	USA	Uganda	1 / 0	(Amman et al., 2012)
2008	Holanda	Uganda	1 / 100	(Amman et al., 2012)
2012	Uganda	Uganda	23 / 65	(Rougeron et al., 2015)
2014	Uganda	Uganda	1 / 100	(Centers for Disease Control and Prevention, 2014)

O fator comum a todos estes surtos ou casos é a associação a uma região de cavernas ou local com população densa de morcegos. Muitos dos indivíduos visitaram uma caverna nos dias anteriores ao início de sintomatologia, sendo que quando analisadas as cavernas existe a confirmação de presença de populações de morcegos (Amman et al., 2012).

CAPÍTULO IV

Transmissão

A infecção por MARV, uma zoonose, é primariamente transmitida a humanos através de um reservatório animal, o morcego da espécie *Rousettus aegyptiacus*, apesar de ainda permanecerem dúvidas se será esta a única espécie de morcego ou animal com o propósito. O meio de contágio de humanos e primatas está ainda por definir, podendo acontecer por meio de fluídos do animal, como fezes ou mesmo aerossóis, ou com ajuda de um vetor, possivelmente através de aberturas na pele ou contato com mucosas (Figura 9) (Centers for Disease Control and Prevention, 2014, 2014).

Sabe-se que o MARV causa infecção em primatas, no entanto não houve, até à data, casos reportados com origem de infecção identificada em primatas fora de ambiente laboratorial pelo que ainda é hipotético se estes transmitem ou não a infecção a humanos em circunstâncias não experimentais (Pigott et al., 2015). Tanto quanto se sabe, os primatas são tão suscetíveis à infecção do MARV quanto os humanos, pois estes não têm a capacidade de criar uma resposta imunitária suficiente e acabam por ceder face à sua virulência.

A transmissão deste vírus ocorre quando há contato com o ARN viral e portanto, todos as estruturas e fluídos em que o vírus se replica ou está presente são possíveis fontes de infecção. A transmissão horizontal entre humanos acontece através do contato direto com tecidos ou fluidos contendo genoma viral como sangue, vômito, urina, fezes, suor, leite materno, saliva, secreções respiratórias e sémen. A pele também é fonte de infecção, uma vez que foi detetado material viral em esfregaços de pele. Após a morte do indivíduo infetado, o vírus mantém-se ativo no organismo aumentando a janela de infecção e colocando em risco todos os que entram em contacto com o cadáver, representando outra forma de contágio. No entanto, a transmissão do vírus não é possível quando a infecção se encontra em período de incubação (Lin et al., 2015; Martina & Osterhaus, 2009; Piercy et al., 2010).

Por comprovar estão os contágios por exposição de mucosas, provado em primatas, e via aerossol, que foi constatado experimentalmente (Allaranga et al., 2010; Piercy et al., 2010).

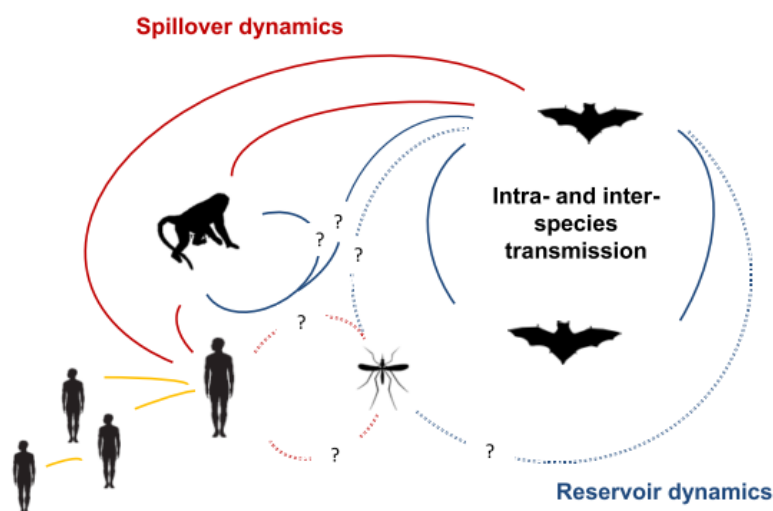


Figura 8 – Esquema de transmissão do vírus de Marburg (adaptado de (Olival & Hayman, 2014)) O morcego é o reservatório animal do MARV e é a partir dele que se realiza o contágio de primatas e humanos, através de um meio de contágio que ainda é desconhecido (considerando-se a hipótese de um vetor). As linhas azuis representam a possível relação entre o reservatório e hospedeiro, as linhas vermelhas representam a transmissão entre hospedeiros (primatas e humanos) e as linhas laranja representam a transmissão entre hospedeiros humanos. Linhas a tracejado representam relações desconhecidas e os pontos de interrogação representam hipóteses por confirmar.

Reservatório Animal

A suspeita de que o reservatório animal seria uma ou várias espécies de morcegos foi sendo fomentada com múltiplas observações. Os morcegos apresentaram sempre uma relação com os vários locais de origem de casos. Sendo este vírus caracterizado por surtos em regiões endêmicas localizadas na África subsariana, o seu reservatório natural tem de ser um animal característico dessas regiões. Estudando a localização geográfica dos surtos, o MARV é característico de regiões secas e arenosas de África. Outra característica destes surtos é a relação que os indivíduos infectados têm com visitas a grutas, que se sabe serem ocupadas por variadas espécies de morcegos (Peterson, Lash, Carroll, & Johnson, 2006). E quando confrontados períodos de transmissão com períodos de reprodução de morcego verifica-se algumas interseções, porém insuficientes como prova irrefutável (Swanepoel et al., 2007).

Adicionalmente, com a detecção de anticorpos anti-MARV, bem como de sequências genómicas em morcegos *R. aegyptiacus*, a teoria de que esta espécie seria um reservatório foi fundamentada (Towner et al., 2007). Mais tarde, quando foi isolado o vírus a partir de

tecidos dos morcegos *R. aegyptiacus* (Figura 10), concluiu-se que esta espécie de morcego seria o reservatório do vírus de Marburg (Towner et al., 2009).



Figura 9 – Morcego da espécie *Rousettus aegyptiacus*, reservatório animal do vírus de Marburg (retirado de <http://www.zoochat.com/1201/egyptian-fruit-bat-rousettus-aegyptiacus-305333/>)

Além da espécie *R. aegyptiacus*, outras espécies como *Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* e *Myonycteris torquata* continuam a ser estudadas como possíveis reservatórios (Centers for Disease Control and Prevention, 2014, 2014; Leroy, Gonzalez, & Baize, 2011; Towner et al., 2007). Estas espécies de morcegos têm a capacidade de permanecer saudáveis aquando da entrada do vírus no seu organismo, suportando a sua replicação com resposta imune adequada, tornando-as um reservatório e meio de transmissão eficaz (Olival & Hayman, 2014).

O MARV foi isolado a partir de *R. aegyptiacus* saudáveis de cavernas distintas, e em análise concluiu-se que o genoma era compatível com os isolados em indivíduos infetados, sendo outro facto que suporta o seu papel como reservatório (Swanepoel et al., 2007).

A identificação do MARV em morcegos *R. aegyptiacus* foi feita em algumas regiões da África subsariana, nomeadamente nas minas de Kitaka no Uganda, nas minas de Goroubwa na República Democrática do Congo e em certas regiões do Gabão e Zimbabué. Os vírus identificados em cada um destes locais estão na sua maioria

relacionados em termos evolutivos, mesmo que geograficamente os locais possam distar entre si até 2000 km. Esta relação é consistente com a mobilidade de *R. aegyptiacus* pela região subsariana (Centers for Disease Control and Prevention, 2014, 2014; Towner et al., 2009).

CAPÍTULO V

Patogénese

A patogénese do MARV não está ainda extensivamente estudada, e a maioria das conclusões e hipóteses existentes derivam de estudos conduzidos em laboratório com animais, principalmente primatas.

Aquando da entrada do MARV no organismo, por lesões na pele ou mucosas, este revela um tropismo para as células do *monocyte phagocyte system* (MPS): monócitos, macrófagos, células dendríticas e células de Kupffer; Estando provado que a proliferação do MARV é feita através destas mesmas células. Outros alvos são as células endoteliais e hepatócitos, segundo estudos em modelos animais. Estudos mostraram que o MARV tem grande afinidade com os tecidos linfóides – gânglios linfáticos e baço – e fígado, por serem os tecidos com maior número de lesões quando analisados em indivíduos com febre hemorrágica por MARV. A invasão das células, com rápida replicação viral, supressão da resposta imunitária e desequilíbrio vascular, desencadeia a doença de Marburg – febre hemorrágica que provoca alterações a nível respiratório, gastrointestinal, vascular e neurológico, e que afeta humanos e primatas (Hartman et al., 2010; Hensley et al., 2011; World Health Organization, 2012).

Um estudo efetuado em macacos da espécie *Macaca fascicularis* concluiu que o MARV invade primeiramente os monócitos, macrófagos e células dendríticas e progressivamente as células hepáticas, seguindo-se as células endoteliais (Hensley et al., 2011). A invasão dos monócitos, macrófagos e das células dendríticas concede ao MARV acesso à circulação linfática e facilita a disseminação do vírus pelo organismo. Através da linfa, o MARV alcança o fígado e o baço onde invade mais macrófagos, células dendríticas e células de Kupffer para se replicar. A consequência é o aumento das transaminases hepáticas – aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) – e posteriormente necrose tecidual (Mehedi, Groseth, Feldmann, & Ebihara, 2011).

A coagulopatia disseminada observada no quadro clínico deste vírus pode estar relacionada com o tropismo hepático, visto que alguns dos fatores de coagulação são produzidos no fígado (Mehedi et al., 2011).

Os **monócitos** são as células fagocitárias em maior número na corrente sanguínea, o que pode explicar a rápida propagação do MARV no organismo e os valores elevados de carga

viral (Ströher et al., 2001). O MARV foi detetado em monócitos de macacos cinomolgos (*Macaca fascicularis*) dois dias após infeção (Fritz, Geisbert, Geisbert, Hensley, & Reed, 2008). A invasão viral dos monócitos e macrófagos provoca a sua ativação e libertação massiva de citocinas, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2, CCL3, CCL4 e TNF, envolvidas em inúmeros processos de resposta imunitária que podem explicar o choque hipovolémico e consequente morte provocados pelo MARV, por possivelmente criarem um desequilíbrio na homeostase e na função de barreira do endotélio (Ströher et al., 2001).

Quanto aos **macrófagos**, são células fagocitárias migratórias muito suscetíveis à infeção por MARV e por isso representam uma forma de disseminação do vírus a todo o organismo (Takada, 2012). A invasão de células migratórias, como são os macrófagos e as células dendríticas, permite que o MARV percorra o organismo pelo sistema linfático e aceda a tecidos hepáticos, vasculares e do baço. Este facto é suportado pela deteção de antígenos e viriões em macrófagos circulantes e associados a tecidos (Ströher et al., 2001).

Em princípio o principal alvo do tropismo do MARV são as **células dendríticas**. Estas são células do tecido hematopoiético, presentes em tecidos linfoides e não linfoides, com capacidade de desencadear uma resposta imunitária face a qualquer invasão do organismo, pela deteção de lesão tecidular ou captura de antígenos (Hensley et al., 2011). A invasão do MARV inibe a maturação das células dendríticas – e consequente proliferação de linfócitos T, que são estimuladas pelas células dendríticas aquando da deteção de antígenos –, e a produção e libertação de citocinas como interferão α (IFN- α), IL-1 β , IL-6, IL-10, RANTES, IL-12 e IL-8. Como consequência não é ativado o mecanismo JAK-STAT (*Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription*) que desencadeia a ação de moléculas antivirais por expressão de ISGs (*IFN-stimulated genes*) (Bosio et al., 2003; Schoggins, 2014).

As **células endoteliais** também são um alvo para o desenvolvimento viral, e como resposta à invasão libertam as citocinas: fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-6, IL-8 e Gro- α /CXCL 1. Pensa-se haver uma relação entre a infeção das células endoteliais e o desequilíbrio vascular, no entanto essa relação não foi definida nem confirmada (Connor et al., 2015; Schnittler, Mahner, Drenckhahn, Klenk, & Feldmann, 1993). Outra teoria, com base nos baixos títulos de MARV nestas células, defende que as alterações do

endotélio e do equilíbrio vascular provavelmente derivam dos efeitos das citocinas libertadas por outro tipo de células, como as células dendríticas (Alves et al., 2010).

Até à data, o mecanismo viral que provoca o choque hipovolémico ainda não foi identificado.

O aumento exponencial de IL-1 β e IL-6 na fase primária de infeção tem sido interpretado como um sinal de sobrevivência do indivíduo em questão. A presença em circulação de IL-10 tem sido apontada como um marcador de mortalidade, assim como os elevados níveis de neoptirina e IL-1RA (Bente, Gren, Strong, & Feldmann, 2009). A variação dos níveis de citocinas acima mencionadas é dependente de variáveis intrínsecas do organismo do indivíduo infetado que permanecem indefinidas.

A patogénese do vírus de Marburg provém da capacidade que este tem de impedir a atuação da resposta imunitária inata do hospedeiro e de manter uma taxa elevada de replicação viral, bem como as consequências a nível vascular. O que se pensa estar na base da patogénese deste vírus é a sua constante estimulação de resposta imunitária por parte do organismo infetado, conduzindo a uma sobrecarga de citocinas em circulação que induzem hemorragias e choque séptico. É necessário entender exatamente que citocinas são libertadas, mediante que fatores e os seus mecanismos de ação pois só dessa forma se perceberá a origem e mecanismo de cada sintoma/ sinal e a forma de o suprimir médica ou farmacologicamente (Connor et al., 2015).

CAPÍTULO VI

Manifestações Clínicas

Doença de Marburg é a designação da doença causada pela infecção pelo vírus de Marburg. Anteriormente designada Febre Hemorrágica de Marburg, a DM é uma doença reconhecida pela Organização Mundial de Saúde. (World Health Organization, 2016) Em termos gerais, a doença de Marburg provoca alterações a nível respiratório, gastrointestinal, vascular e neurológico, entre outras. Os sinais mais característicos desta doença são os hemorrágicos, aparecendo por volta da segunda semana de doença, no entanto tem sido observado ao longo dos anos que nem todos os indivíduos infetados os desenvolvem. (Hartman et al., 2010)

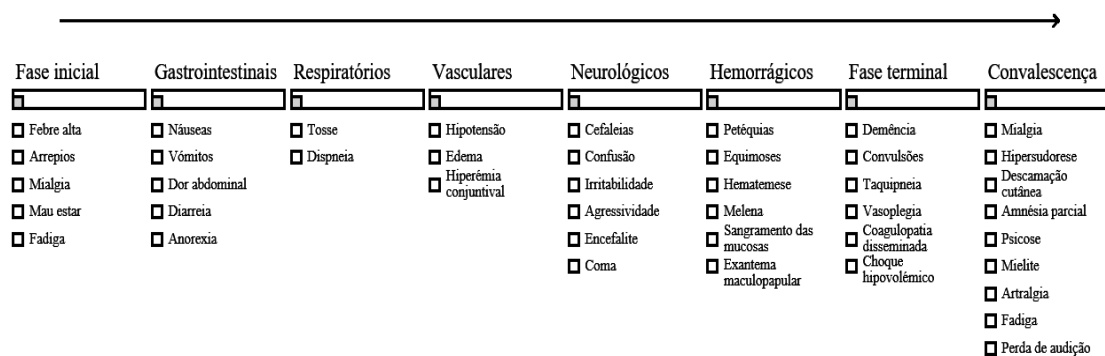


Figura 10 – Cronologia da sintomatologia associada à doença de Marburg (adaptado de (Hartman et al., 2010))

Após um período de incubação variável entre 2 e 21 dias, dependendo da via de infecção e dose viral inicial, cefaleias e prostração são os primeiros sintomas observados. De um modo geral a sintomatologia evolui de forma abrupta, com aparecimento de síndrome gripal – febre alta, rondando os 40°C, arrepios, mialgia e mau estar. Em grande percentagem dos casos reportados, os indivíduos também desenvolveram sintomas gastrointestinais como náuseas e vômitos, dor abdominal, anorexia e diarreia. Todos os sintomas referidos surgem na **fase de disseminação** do vírus, que tem duração de sensivelmente quatro dias. A evolução da infecção pode ocorrer rápida ou gradualmente, onde se observa uma evolução sequencial do quadro sintomatológico numa janela de três

a cinco dias após o primeiro sinal ou sintoma (Bente et al., 2009; Sarwar et al., 2010; Van Paassen et al., 2012; World Health Organization, 2012, 2016).

Após a fase de disseminação segue-se a **fase precoce de multiplicação nos órgãos** (*early organ phase*) que dura entre os dias cinco e treze da doença. Nesta fase a evolução da doença é evidente, com aparecimento de sintomas que demonstram comprometimento de vários órgãos, entre eles o pâncreas, rins e fígado. Começam a surgir lesões da pele (Figura 11) e mucosas como exantema maculopapular – uma manifestação comum das doenças infecciosas sistêmicas (Figura 12) –, bem como disfagia, faringite, bradicardia, dispneia, edema, hiperémia conjuntival (Figura 13), linfadenopatia, leucopénia e trombocitopenia. (Bente et al., 2009; Sarwar et al., 2010; World Health Organization, 2012)



Figura 11 – Lesões dermatológicas em indivíduo com doença de Marburg (retirado de <http://www.omicsonline.org/brazil/marburg-virus-peer-reviewed-pdf-ppt-articles/>)

A nível do sistema neurológico, o indivíduo pode apresentar confusão, delírios, irritabilidade, agressividade e encefalite, esta última podendo provocar outros sintomas do foro neurológico, como sensibilidade à luz ou convulsões, de acordo com a área específica do cérebro envolvida. Nesta fase começam também as demonstrações hemorrágicas do vírus, com aparecimento de petéquias, equimoses, hematémese, melena, sangramento de mucosas. Outra alteração é o aumento das enzimas hepáticas, como a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST). (Bente et al., 2009; Sarwar et al., 2010; World Health Organization, 2012)

A fase mais avançada da infeção, **fase tardia de multiplicação nos órgãos** (*late organ phase*), normalmente inicia-se a partir do décimo terceiro dia de doença e dela podem

resultar dois panoramas distintos, onde o indivíduo pode iniciar o período de convalescença ou sucumbir à infecção. Quando comparadas as cargas virais de indivíduos que sobrevivem e indivíduos que sucumbem à doença, conclui-se que as cargas virais de sobreviventes são significativamente menores, podendo ser até 1000 vezes inferiores. Outro parâmetro que diferencia os dois cenários é o título de anticorpos anti-MARV que em casos de sucesso têm níveis elevados, comparativamente aos níveis quase indetetáveis dos casos mortais. (Hartman et al., 2010)



Figura 12 – Exantema maculopapular em indivíduo com doença de Marburg (adaptado de <http://www.antimicrobe.org/e8.asp>)



Figura 13 – Hiperémia conjuntival em indivíduo com doença de Marburg (retirado de <https://www.youtube.com/watch?v=vzMVry7ZQFo>)

Face a um mau prognóstico, os sintomas das fases anteriores mantêm-se e surge nova sintomatologia como inquietação, perda de consciência, confusão, demência, convulsões, desidratação, distúrbios metabólicos, taquipneia, vasoplegia, coagulopatia disseminada,

falha multiorgânica, choque hipovolêmico e coma. (Bente et al., 2009; Hartman et al., 2010; Sarwar et al., 2010; World Health Organization, 2012)

A morte normalmente ocorre na segunda semana, entre os dias seis e dezasseis, estando relacionada com a evolução do quadro clínico do doente, a celeridade com que os sintomas se manifestam mas principalmente com as consequências do choque hipovolêmico quase inevitável. (Bente et al., 2009; Sarwar et al., 2010)

No caso da **fase de convalescença** os sintomas mais comuns são a fadiga, mialgia, hipersudorese, descamação cutânea, amnésia parcial, psicose, uveíte, mielite, artralgia, mielite, perda de audição e infecções secundárias como hepatite recorrente, como sequela do choque que o organismo suportou. Neste panorama o doente enfrenta um longo período de recuperação. (Bente et al., 2009)

CAPÍTULO VII

Diagnóstico Laboratorial

Face à sintomatologia que surge no início da infeção do MARV, é necessário um diagnóstico laboratorial pois apenas o diagnóstico diferencial não é suficiente para se concluir que se trata de um caso de doença de Marburg. Não só a sintomatologia não é específica para o MARV, pois todos os outros filovírus provocam igualmente os mesmos sintomas, como é exibida por outras doenças características de África, como por exemplo malária, febre tifoide, febre-amarela, leptospirose, disenteria bacteriana e septicémia meningocócica (Hartman et al., 2010).

Laboratorialmente estão disponíveis técnicas como isolamento viral, ELISA, RT-PCR, microscopia eletrónica e imunohistoquímica. Através destas técnicas é possível fazer deteção virológica, serológica e molecular do MARV a partir de soro ou sangue. No entanto o manuseamento do MARV exige instalações com nível de segurança 4 (Ver página 46), o que dificulta o diagnóstico fácil deste vírus uma vez que existem poucos laboratórios que cumprem as exigências desse nível em todo o mundo (Centers for Disease Control and Prevention, 2014). De forma a combater o problema, algumas das técnicas foram aperfeiçoadas de forma a poderem ser realizadas em condições menos exigentes.

As técnicas mais utilizadas para diagnóstico são o RT-PCR, ELISA para deteção de IgMs durante a infeção e de IgGs durante a recuperação da doença de Marburg – e ELISA para deteção de antígenos virais durante a fase aguda de infeção (Rougeron et al., 2015).

A utilização da proteína GP do MARV como antígeno no ensaio **ELISA** (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) permite detetar anticorpos monoclonais anti-MARV até nove semanas após infeção, nas fases aguda e subaguda, contrariando a ideia de que as IgMs apenas seriam detetadas no pico da infeção (Nakayama et al., 2010).

O **RT-PCR** (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) é o único meio de diagnóstico que permite distinguir a estirpe do vírus em questão, por meio de primers específicos para cada estirpe conhecida do MARV. Recorrendo a este ensaio com os primers apropriados é possível a deteção de um leque alargado de estirpes, não só do MARV mas de todos os filovírus. Para além de ser um método fácil de executar, com obtenção de resultados rápida, permite também a quantificação da carga viral.

Adicionalmente, é um ensaio que permite ser realizado em infraestruturas básicas (Cnops et al., 2016; Ogawa et al., 2011).

O **RT-LAMP** (*Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification*) é um ensaio que permite a amplificação de sequências nucleotídicas baseada na síntese de cadeias complementares através da enzima *Bst DNA polymerase* – ADN polimerase da bactéria *Bacillus stearothermophilus* – e de seis primers específicos para oito locais genómicos. É um teste recente que permite a deteção das linhagens Musoke e Ravn do MARV e possibilita a realização de diagnósticos em laboratórios de campo de forma segura e fácil (Kurosaki, Grolla, Fukuma, Feldmann, & Yasuda, 2010).

Outro método direto de deteção é a **isolamento viral** que, como já referido, apenas pode ser realizado em instalações de nível 4 de biossegurança. Outro inconveniente desta técnica é o facto de demorar muito tempo para obtenção de resultados pois é necessário inocular o vírus em culturas de células a partir de sangue, biópsias, fluidos corporais ou esfregaços bucais, sendo que os primeiros dois são mais eficientes (Rougeron et al., 2015).

A **microscopia eletrónica** (ME) permite fazer a deteção direta da presença de partículas virais, mas o método não é suficiente para confirmação do diagnóstico e necessita da realização de um ensaio adicional. A ME é realizada a partir de sangue, tecidos e sobrenadantes de cultura de células (Rougeron et al., 2015).

Por fim, a **imunohistoquímica** também é utilizada como meio de diagnóstico, sendo um método direto de deteção de antígenos virais em tecidos, com recurso a anticorpos específicos (Zaki et al., 1999).

Nível de Segurança

Como já referido anteriormente, sendo o MARV um filovírus e por ser considerado uma ameaça à saúde pública, foi classificado como *Select Agent* pelo Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) do Instituto de Saúde e Serviços Humanos dos EUA, definido como um agente com potencial de ameaça à saúde e segurança de humanos, animais e plantas. Na lista de *Select Agents* do CDC constam 65 agentes de ameaça, entre vírus, bactérias e toxinas. (Centers for Disease Control and Prevention, 2016; Federal Select Agent Program, 2014)

Exige também que seja manuseado em laboratório com Nível de Segurança 4 (*Biosafety Level 4 – BSL-4*), de acordo com os critérios de biossegurança laboratorial que definem quatro níveis mediante as características conhecidas/desconhecidas dos microrganismos. (Lin et al., 2015; Piercy et al., 2010; U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, & National Institutes of Health, 1999)

O Nível de Segurança 4 (BSL-4), segundo a classificação, é o imposto para agentes microbiológicos sem imunização ou tratamento que representam elevado risco de transmissão por aerossol e têm elevada mortalidade associada aquando da infeção. Também incluídos neste nível estão os agentes dos quais ainda não se conhece o risco de transmissão, sendo que até serem suficientemente estudados permanecem com as exigências de BSL-4. (U.S. Department of Health and Human Services et al., 1999)

As especificações dos laboratórios de BSL-4 incluem: práticas obrigatórias, sendo estas o acesso limitado e controlado, sinais de risco biológico afixados e visíveis, precaução com objetos cortantes no exterior e interior do laboratório, manual de segurança que inclui as normas de descontaminação de resíduos e o protocolo de observação médica dos funcionários, mudança de roupa à entrada da sala de trabalho, obrigatoriedade de banho à saída do laboratório e descontaminação de todo o material que sai do edifício e de todo os resíduos; barreiras primárias englobando o material que protege o operador, do qual faz parte a utilização de uma câmara de segurança biológica III ou câmara de segurança biológica I/II combinada com fato protetor total com sistema de ventilação próprio e pressão positiva; barreiras secundárias da qual fazem parte uma unidade funcional independente, antecâmara que antecede a entrada no laboratório, acesso com porta dupla de fecho automático, separação física dos corredores de acesso, sistemas de ventilação exclusivos do laboratório sem recirculação de ar com sistema de vácuo e de descontaminação, pressão negativa dentro da unidade de trabalho, autoclave, banco e lavatório próximo da saída da mesma. (U.S. Department of Health and Human Services et al., 1999)

É exigência que todos os funcionários sejam instruídos sobre os procedimentos e competentes para os desempenhar, tendo conhecimento de todas as especificações inerentes. (U.S. Department of Health and Human Services et al., 1999)

CAPÍTULO VIII

Terapêutica

Até à data não existe um tratamento antiviral específico para a infecção pelo MARV ou por outro filovírus (Sarwar et al., 2010). A abordagem não passa por tratar a origem do quadro clínico, mas sim as consequências da infecção.

Tendo em conta a vertente hemorrágica da doença de Marburg, a intervenção consiste em manter um volume circulatório, nível de oxigénio, pressão arterial e perfusão fisiológicos bem como conservar o balanço eletrolítico, através de administração de fluídos e transfusões de sangue e fatores de coagulação. A administração de antibióticos também é utilizada em infecções consequentes, bem como de outras classes de fármacos de acordo com a necessidade (Centers for Disease Control and Prevention, 2014; Sarwar et al., 2010).

Desenvolvimento de novas terapêuticas

Inúmeras terapêuticas têm sido estudadas em modelos animais mas até à data ainda nenhuma foi aprovada para utilização humana, no entanto existem ensaios com moléculas promissoras. Alguns dos tratamentos referidos aguardam autorização para ensaios clínicos em humanos, no entanto os ensaios estão sempre condicionados pela esporadicidade de surtos e casos humanos de MARV.

A utilização da proteína anticoagulante c2 de nematode recombinante (rNAPc2) como tratamento de pós-exposição tem sido estudada pela utilidade do seu potencial de antitrombótico em reverter a coagulopatia disseminada provocada pelo MARV. Esta terapêutica foi testada em macacos *Macaca Mulatta* após exposição destes à estirpe Angola do MARV, resultando no aumento de sobrevivência em 17% e do tempo até à morte em 1,7 dias (Geisbert et al., 2007). Uma vez que a proteção foi apenas parcial, o desafio desta terapêutica passa por adicionar adjuvantes de forma a aumentar o seu potencial, bem como alargar o seu espectro de ação a mais estirpes conhecidas do MARV.

O FGI-103, composto de baixo peso molecular, foi identificado num estudo efetuado com EBOV e quando testada em ratinhos infetados com uma dose letal de uma estirpe de MARV modificada (dotada da capacidade de infetar roedores), administrada após 24

horas da infecção por MARV, provou ser uma molécula com potencial inibidor da patogênese deste vírus. Os ratinhos tratados com FGI-103 exibiram carga viral baixa e níveis baixos de TNF- α , IFN-gama, IL-6 e níveis fisiológicos de enzimas hepáticas. Embora o mecanismo de inibição do FGI-103 permaneça por definir bem como a participação de outras moléculas no processo, representa um avanço nesta área e um possível tratamento para o MARV (Warren, Warfield, Wells, Enterlein, et al., 2010).

A vacina recombinante de vírus da estomatite vesicular atenuada (rVSV), expressando a proteína GP da estirpe Musoke do MARV demonstrou evidência de eficácia como tratamento pós-exposição ao vírus, com 100% de sobrevivência em primatas após administração 30 minutos após infecção. A desvantagem deste tratamento em cenário de surto é a janela em que tem de ser administrada pois após 2 dias de infecção a eficácia já é nula. No entanto pode ser uma opção viável para infecções acidentais em ambiente laboratorial em que é possível fazer a administração no *timing* em que a vacina é eficaz (Daddario-DiCaprio et al., 2006).

O BCX4430 é um análogo sintético da adenosina capaz de inibir a ARN polimerase viral, estudado como tratamento de pós-exposição à estirpe Musoke do MARV e restantes filovírus em macacos *Macaca fascicularis*. O composto foi administrado até 48 horas depois da infecção continuando com administrações duas vezes por dia até 14 dias depois, e provou ser totalmente capaz de inibir a replicação e consequente infecção do primata. O BCX4430 demonstrou um ótimo perfil de segurança e aguarda resultados do ensaio clínico de fase 1 em humanos, terminado em Maio de 2016 (ClinicalTrials.gov, 2016a; Warren et al., 2014).

O AVI-7288 é um oligómero antisense concebido para impedir a replicação viral ao bloquear a transcrição do gene da proteína NP por se ligar ao seu ARN mensageiro. Este composto foi testado em macacos *Macaca fascicularis* infetados por MARV, através de administrações 1, 24, 48 e 96 horas após infecção em grupos distintos, por um período de 14 dias. Nos grupos de macacos com administração 1, 24 e 96 horas após infecção, a sobrevivência foi de 86%, enquanto no grupo com administração 48 horas após infecção todos os macacos sobreviveram (em contraste com o grupo de controlo em que foi administrada uma solução salina, resultando na morte da totalidade de macacos). Em conclusão, este estudo provou que o AVI-7288 é capaz de proteger da infecção macacos

M. fasciculares com administrações até 96h após infecção durante 14 dias (Warren et al., 2016).

O mesmo composto foi submetido a um ensaio clínico de fase 1 em humanos, com administrações de AVI-7288 em grupos com diferentes dosagens definidas, por um período de 14 dias. Apurou-se que até 16 mg/kg, o AVI-7288 não representa qualquer ameaça à segurança do indivíduo bem como não provoca efeitos adversos. O AVI-7288 representa uma opção de tratamento de pós-exposição segura, no entanto ainda não testada em humanos infectados. (Heald et al., 2015)

CAPÍTULO IX

Prevenção e Controlo

Face a uma doença que não possui tratamento ou meio de imunização, a estratégia passa pela prevenção e controlo de infeção. Este é um assunto de constante debate entre a OMS, o CDC, Cruz Vermelha e outras organizações especializadas em saúde. O controlo do surto consiste na gestão de casos e controlo da infeção, educação e mobilização da população, vigilância epidemiológica e organização logística da região (Figura 15) (Allaranga et al., 2010; World Health Organization, 2012).

Uma das formas de transmissão mais comuns em surtos é por infeção nosocomial e a principal medida de controlo é evitar que tal aconteça. A falta de condições das instalações, técnicas de trabalho deficientes, nomeadamente reutilização de material, e as más condições sanitárias são fatores que contribuem para o contágio em cenários de prestação de cuidados de saúde, representando um enorme contributo para surtos de febres hemorrágicas. Além das instalações de saúde, outra questão problemática é a falta destas instalações por todo o continente africano, obrigando os habitantes a recorrerem a curandeiros que não possuem conhecimentos e recursos para lidar com o MARV. Para combater esta realidade é importante que haja informação da população e prestadores de cuidados de saúde, especialmente em regiões endémicas em que o contágio acontecia derivado do contacto com cadáveres, roupas e fluídos corporais. (Figura 14). O trabalho que tem sido feito neste sentido tem mostrado resultados nos casos e surtos mais recentes (Jeffs et al., 2007; World Health Organization, 2012).

Primeiramente é importante o isolamento do indivíduo com suspeita ou confirmação de diagnóstico, bem como o seguimento de todos os contactos do indivíduo infetado para que também estes sejam testados serologicamente e caso seja necessário, isolados. O diagnóstico rápido é um fator crucial para o controlo do surto, permitindo que o isolamento apenas inclua os indivíduos infetados e impedindo contágio de terceiros (Bausch et al., 2007; Timen et al., 2009; World Health Organization, 2012).

Outra ação preventiva de infeções nosocomiais é a utilização de materiais de barreira como proteção do profissional de saúde, como roupa de proteção, luvas, máscara e óculos, bem como técnicas de assepsia e esterilização de material. O cumprimento do protocolo

de segurança para cuidadores representa segurança para os próprios e proporciona uma melhor prestação de cuidados (Bausch et al., 2007; Timen et al., 2009).

Um cuidado que tem sido tomado é a vigilância de regiões endêmicas de forma a identificar casos o mais cedo possível. O acesso a locais de perigo de contágio, ou seja, já associados a algum caso ou surto também têm sido negados a visitas (Roberts & Andrews, 2008).

Os animais importados de países endêmicos são obrigados a permanecer em quarentena, onde são examinados e testados para um leque de doenças, como forma de garantir que os animais importados para países não endêmicos não representam uma ameaça para a saúde pública do país (Roberts & Andrews, 2008).

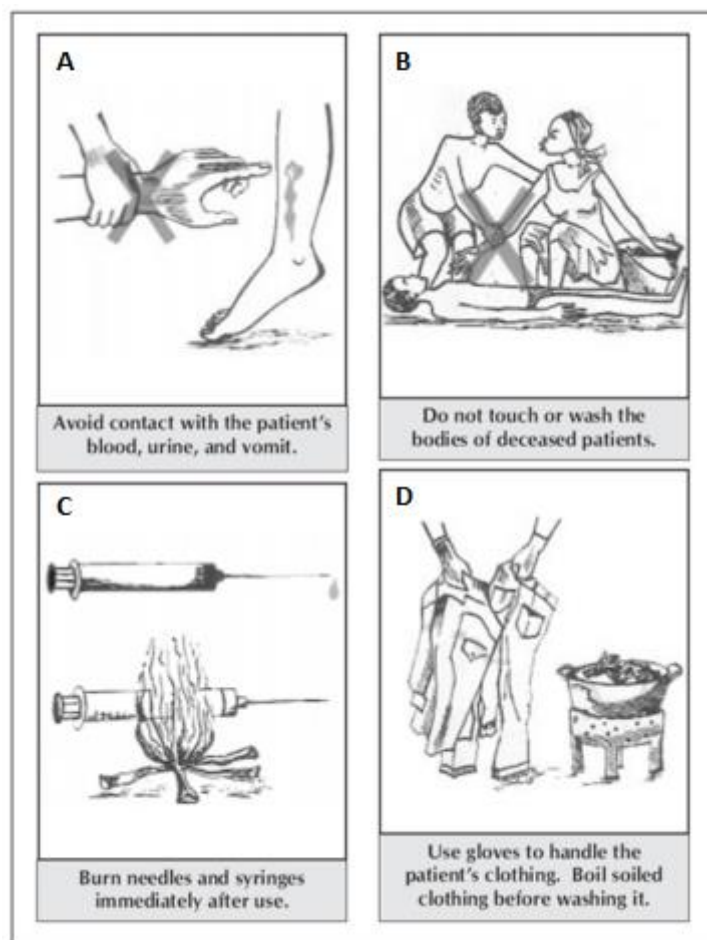


Figura 14 – Suporte visual utilizado para educar a população em regiões de surtos (adaptado de (Brauburger et al., 2012)) (A) Evitar contato com fluidos corporais do indivíduo infectado, como sangue, urina e vômito; (B) Não tocar ou cuidar de cadáveres; (C) Queimar todo o material médico após utilização; (D) Não estabelecer contato direto com roupa ou pertences dos indivíduos infectados e fervê-los antes de lavar.

Uma ação muito importante é a educação das populações e a criação de confiança nos profissionais de saúde, de forma que as suas intervenções sejam bem recebidas. As populações associam a ida a um hospital a mau presságio porque em grande parte dos casos o indivíduo acaba por falecer, e por isso é importante que o trabalho feito pelas organizações sejam entendido como benéfico e de confiança. Para isso é essencial saber comunicar com a população local, de acordo com a sua cultura e crenças, através da inclusão de um apoio social e psicológico nas equipas de gestão de surtos. Um exemplo claro da necessidade de recursos sociais é a realização de funerais, que face a um surto não pode ser realizado da forma habitual pois o contacto com o cadáver representa uma via de contágio. Mas esta temática levanta questões culturais, espirituais e religiosas que até hoje são difíceis de ultrapassar (Bausch et al., 2007; Jeffs et al., 2007; World Health Organization, 2012).

A confirmação dos meios de contágio a partir do reservatório natural será um passo importante na prevenção e controlo da doença de Marburg, uma vez que a partir do estudo do animal e do seu habitat será possível vigiar as regiões endémicas e tomar as medidas necessárias, como restrição do acesso a essas regiões e serovigilância dos animais, de modo a evitar o contacto com os animais e outros produtos infetados (Timen et al., 2009).

A criação de infraestruturas de saúde com recursos para gerir surtos de MARV e outras doenças altamente contagiosas e com elevada taxa de mortalidade, é um dos passos a tomar para que as regiões endémicas sejam capazes de reagir, estando constatado que é precisamente por falta de tais condições que o número de fatalidades é maior comparativamente ao mesmo fator em países mais desenvolvidos, onde estas condições são asseguradas (Mehedi et al., 2011).

Os países com regiões endémicas devem ter um governo sensibilizado para esta situação emergente das febres hemorrágicas e reagir com criação de protocolos de vigilância permanentes, bem como as equipas de cuidados de saúde, fomentando a prevenção e a deteção e controlo de novos casos (Allaranga et al., 2010). A gestão dos meios de comunicação e da informação que é transmitida também deve ser realizada de modo a não provocar reações que venham a dificultar a contenção do surto e sua resolução.

Na figura 15 são esquematizados os procedimentos para controlo e gestão de surtos, definidos pela Organização Mundial de saúde.

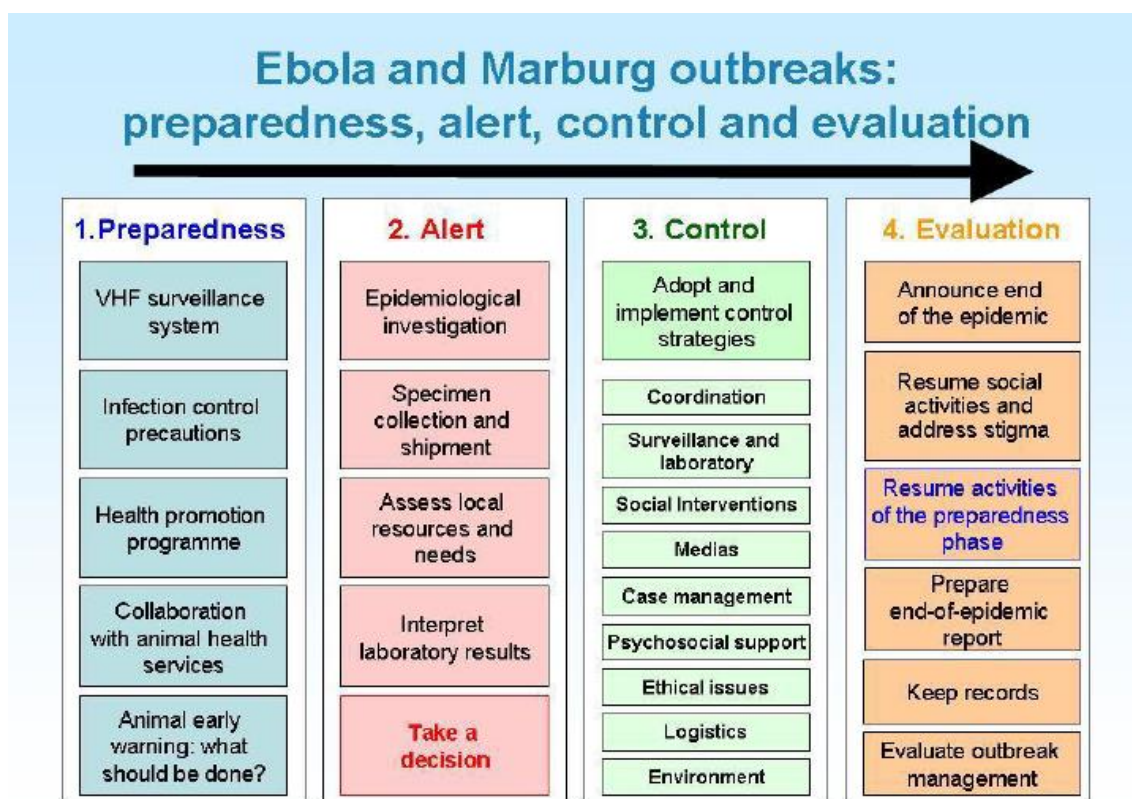


Figura 15 – Esquema da estratégia de prevenção e controlo de surtos de Ébola e Marburg, segundo a Organização Mundial de Saúde (retirado de (World Health Organization, 2014)) (1) Prevenção de infeções, através de vigilância de regiões endémicas, adoção de cuidados para prevenção de infeção, criação de programas de promoção de saúde e cuidados e colaboração com serviços de controlo animal de forma a haver preparação para a ocorrência de um surto; (2) Caso seja identificada alguma situação suspeita, desencadeia-se uma investigação epidemiológica com colheita de espécimes e avaliação dos locais de possível origem, e posterior interpretação dos resultados para uma tomada de decisão informada; (3) Face à confirmação de surto são adotadas e implementadas medidas de controlo com coordenação de todos os serviços envolvidos na gestão de surtos para uma adequada vigilância, análise laboratorial, intervenção sociais, apoio psicossocial e gestão de casos de infeção, comunicação social, ética, logística e ambiental; (4) Uma vez avaliada a situação e constatado o controlo do surto, é anunciado o fim do mesmo e elaborados os relatórios relativos as todas as observações e ações tomadas, bem como avaliação das intervenções, de forma a manter registos para a posterioridade. São também retomadas as medidas de prevenção e as atividades sociais normais da região, com constante informação e apoio psicossocial da população.

Desenvolvimento de vacinas

Atualmente não existe vacina para o vírus de Marburg, ou outro filovírus. A vacina ideal do MARV terá de ter a capacidade de proteger contra todas as estirpes do vírus em cenário de surto. Até à data já foram inúmeras as tentativas de desenvolver uma vacina eficaz, algumas conferindo proteção em cenários específicos. Por exemplo, uma vacina que

confere imunidade progressivamente pode ter interesse em profissionais de saúde ou investigadores, por não necessitarem de proteção imediata, como é o caso de um cenário de surto (Bausch et al., 2007).

Foi realizado um estudo com três tipos de vacinas: a primeira possui um plasmídeo de ADN com expressão génica otimizada como vetor (ADN-GP), a segunda constituída por um vetor de adenovírus recombinante (rAd), e por fim a terceira com combinação dos dois vetores. Todas estas vacinas têm um gene codificante da proteína GP da estirpe Angola do MARV. Quando testadas, com posterior infeção dos macacos com dose letal de MARV Angola, apenas preveniram a morte de macacos *M. fascicularis* após infeção viral. Uma desvantagem reside no facto de serem um tipo de vacinas ainda recente, representando ainda desconhecimento a nível das respostas que induz no organismo, como por exemplo a possibilidade de integração da sua informação no genoma. Mas as vacinas de ADN apresentam grande número de vantagens como fácil reprodutibilidade e produção e capacidade de estimulação de respostas imunitária e humoral no hospedeiro, no entanto ainda não se conseguiram reproduzir em humanos os resultados obtidos em modelos animais (Geisbert et al., 2010).

Uma vacina que utiliza *replicons* de ARN do vírus da encefalite equina venezuelana (VEE) como vetores foi desenvolvida e testada em macacos *Macaca fascicularis*. Foram produzidas vacinas com expressão da proteína GP do MARV, com a proteína NP do MARV e com ambas as proteínas, cada uma testada num grupo de macacos. As vacinas expressando a proteína GP e proteína GP+NP da estirpe Musoke do MARV demonstraram conferir proteção total contra a infeção, com três administrações intercaladas por 28 dias. Os *replicons* são úteis neste contexto por não se propagarem entre células e conservarem a capacidade de replicação sem estarem incluídos em partículas virais. (Hevey, Negley, Pushko, Smith, & Schmaljohn, 1998).

A vacina desenvolvida com recurso a um adenovírus complexo não replicativo (CAdVax) consiste na junção de quatro vetores com expressão dos genes codificantes das proteínas GP do MARV, EBOV e SUDV e da proteína NP do MARV e EBOV. A administração da CAdVax foi feita nos dias 0 e 63 do ensaio. Nos dias 105 e 177, um dos dois grupos de macacos foram infetados com a estirpe Musoke do MARV e o vírus Sudan (SUDV), respetivamente. O segundo grupo de macacos foi infetado nos dias 106 e 175 como vírus Ébola (EBOV) e a estirpe Ci67 do MARV, respetivamente. As doses utilizadas foram

1000 vezes superiores à dose letal dos vírus utilizados, e provou-se de proteção total contra o MARV, EBOV e SUDV. A desvantagem desta formulação de vacina é a prevalência de anticorpos neutralizantes contra adenovírus na população mundial, o que pode comprometer a eficácia da vacina em humanos (Swenson, Wang, et al., 2008).

Outro dos avanços promissores é a vacina de vírus da estomatite vesicular recombinante atenuada (rVSV) em que é expresso o gene codificante da proteína GP do MARV, que estimula a produção de anticorpos não neutralizantes pelo organismo. Uma das vantagens de utilização deste vírus é a mínima probabilidade de existirem anticorpos do vírus no indivíduo por ser um vírus de ambiente agrícola, pelo que a resposta imunitária será dirigida à proteína GP do MARV que substitui a glicoproteína do VSV. No entanto esta opção de imunização ainda não é aprovada derivado das questões de segurança que têm sido colocadas relativamente à capacidade replicativa do vírus. Outra opção é utilizando vetores de VSV com GPs de MARV, EBOV e SUDV para amplificar a janela de imunização para os vírus das febres hemorrágicas. Os estudos destas vacinas foram realizados em macacos *Macaca mulatta* e apenas um desenvolveu sinais de virémia. No entanto quando analisados dados bioquímicos foi observado aumento de enzimas hepáticas, sugerindo que a vacina não anula completamente a patogenicidade do vírus (Daddario-DiCaprio et al., 2006; Geisbert & Feldmann, 2011). Para além de representar uma boa opção profilática, também se demonstrou total eficácia em tratamento pós-exposição para o MARV e EBOV quando administrada 20 a 30 minutos após a exposição (Daddario-DiCaprio et al., 2006). A vacina de rVSV com expressão da proteína GP do MARV não possui nenhum ensaio clínico, no entanto existem ensaios clínicos de fase 1, 2 e 3 para avaliação da vacina rVSV com proteína GP de EBOV (ClinicalTrials.gov, 2016b, 2016c, 2016d, 2016e, 2016f).

Uma das vacinas mais auspiciosas é formulada com *virus-like particles* (VLPs) sem capacidade replicativa e infecciosa que desencadeia a resposta imunitária pela sua própria estrutura proteica (construída pelas proteínas VP40 e GP do MARV), obtidas através de transfeção de um vetor contendo o gene VP40 em células apropriadas. As VLPs são adicionadas de um adjuvante para aumentar a sua eficácia, sendo que em um estudo foram adjuvantadas com MARV inativado e a vacina testada em cobaias e macacos *Macaca fascicularis* com três administrações espaçadas de 42 dias. O resultado foi 100% de proteção contra virémia, replicação viral e lesões em tecidos provocadas por infeção de

três estirpes do MARV – Musoke, Ravn e Ci67 (Swenson, Warfield, et al., 2008). Atualmente não existem ensaios clínicos concluídos ou a decorrer.

Os avanços na vertente de desenvolvimento de uma intervenção profilática têm sido significativos nos últimos anos, contudo ainda não existem vacinas aprovadas para este vírus emergente ou para outro filovirus. É necessário melhorar perfis de segurança e aumentar a proteção conferida para todas as estirpes do MARV.

Considerações Finais

Da perspectiva de investigação, o vírus de Marburg é ainda negligenciado, sendo preterido por estudos direcionados ao vírus Ébola. Consequentemente, o que se verifica é a adaptação de ilações de estudos do vírus Ébola, para a explicação dos mecanismos do MARV, o que não deixa de ser duvidoso tendo em conta as diferenças genómicas e proteicas entre os dois vírus, ou mesmo géneros.

O conhecimento dos mecanismos utilizados pelo vírus é crucial para o desenvolvimento de terapêuticas e meios de imunização, que têm demonstrado resultados promissores.

O continente africano detém um número considerável de países subdesenvolvidos que não possuem recursos, infraestruturas e populações informadas, que lhes permita combater rápida e eficazmente um cenário de surto. Uma agravante deste fator são as regiões endémicas do MARV que abrangem áreas consideráveis desses países, mais precisamente na região subsariana.

O alargamento das áreas endémicas é outra questão de preocupação, que pode ocorrer face à alteração dos padrões climáticos. Por esta via, os habitats do reservatório animal podem sofrer alterações e com elas surgem novas regiões endémicas do MARV.

A globalização também afeta o controlo de vírus endémicos, pela atual facilidade de movimentação de pessoas e bens, representando um meio fácil de disseminação de agentes patogénicos.

O potencial como arma biológica é outro ponto de realce, a que deve ser dada a devida atenção, com definição de estratégias de antecipação e contenção deste tipo de ameaça, adicionalmente à impreterível necessidade de tratamento e vacina para a doença de Marburg.

A estratégia não passa apenas pelo desenvolvimento de meios de tratamento e imunização, mas pela combinação destes com intervenções de informação da população, prevenção e controlo da infeção e seus agravantes. É necessário criação de meios de vigilância de saúde pública e de medidas preventivas de infeção, com melhoria das condições de trabalho e recursos disponíveis nos países de risco.

Referências Bibliográficas

- Adjemian, J., Farnon, E. C., Tschioke, F., Wamala, J. F., Byaruhanga, E., Bwire, G. S., ... Rollin, P. E. (2011). Outbreak of Marburg Hemorrhagic Fever Among Miners in Kamwenge and Ibanda Districts, Uganda, 2007. *Journal of Infectious Diseases*, 204(SUPPL. 3), S796–S799. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir312>
- Albariño, C. G., Wiggleton Guerrero, L., Spengler, J. R., Uebelhoer, L. S., Chakrabarti, A. K., Nichol, S. T., & Towner, J. S. (2015). Recombinant Marburg viruses containing mutations in the IID region of VP35 prevent inhibition of Host immune responses. *Virology*, 476, 85–91. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.002>
- Allaranga, Y., Kone, M. L., Formenty, P., Libama, F., Boumandouki, P., Woodfill, C. J. I., ... Yada, A. (2010). Lessons learned during active epidemiological surveillance of Ebola and Marburg viral hemorrhagic fever epidemics in Africa. *East African Journal of Public Health*, 7(1), 32–38. <http://doi.org/10.4314/eajph.v7i1.64673>
- Alves, D. a, Glynn, a R., Steele, K. E., Lackemeyer, M. G., Garza, N. L., Buck, J. G., ... Reed, D. S. (2010). Aerosol Exposure to the Angola Strain of Marburg Virus Causes Lethal Viral Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Veterinary Pathology*, 47(5), 831–851. <http://doi.org/10.1177/0300985810378597>
- Amman, B. R., Carroll, S. A., Reed, Z. D., Sealy, T. K., Balinandi, S., Swanepoel, R., ... Towner, J. S. (2012). Seasonal Pulses of Marburg Virus Circulation in Juvenile Rousettus aegyptiacus Bats Coincide with Periods of Increased Risk of Human Infection. *PLoS Pathogens*, 8(10), e1002877. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877>
- Baltimore, D. (1971). Expression of Animal Virus Genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235–241.
- Bamberg, S., Kolesnikova, L., Möller, P., Klenk, H.-D., & Becker, S. (2005). VP24 of Marburg Virus Influences Formation of Infectious Particles. *Journal of Virology*, 79(21), 13421–33. <http://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13421-13433.2005>
- Banadyga, L., Dolan, M. A., & Ebihara, H. (2016). Rodent-adapted filoviruses and the molecular basis of pathogenesis. *Journal of Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.008>

- Bausch, D. G., Feldmann, H., Geisbert, T. W., Bray, M., Sprecher, A. G., Boumandouki, P., ... Winnipeg Filovirus Clinical Working Group. (2007). Outbreaks of Filovirus Hemorrhagic Fever: Time to Refocus on the Patient. *The Journal of Infectious Diseases*, 196S(Suppl 2), S136–S141. <http://doi.org/10.1086/520542>
- Bausch, D. G., Nichol, S. T., Muyembe-Tamfum, J. J., Borchert, M., Rollin, P. E., Sleurs, H., ... Swanepoel, R. (2006). Marburg Hemorrhagic Fever Associated with Multiple Genetic Lineages of Virus. *The New England Journal of Medicine*, 355(9), 909–919. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa051465>
- Bausch, D. G., Sprecher, A. G., Jeffs, B., & Boumandouki, P. (2008). Treatment of Marburg and Ebola hemorrhagic fevers: A strategy for testing new drugs and vaccines under outbreak conditions. *Antiviral Research*, 78, 150–161. <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.01.152>
- Becker, S., Klenk, H. D., & Muhlberger, E. (1996). Intracellular Transport and Processing of the Marburg Virus Surface Proteins in Vertebrate and Insect Cells. *Virology*, 225, 145–155. <http://doi.org/10.1006/viro.1996.0582>
- Becker, S., Rinne, C., Hofsäss, U., Klenk, H. D., & Muhlberger, E. (1998). Interactions of Marburg Virus Nucleocapsid Proteins. *Virology*, 249, 406–417. <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9328>
- Bente, D., Gren, J., Strong, J. E., & Feldmann, H. (2009). Disease modeling for Ebola and Marburg viruses. *Disease Models & Mechanisms*, 2, 12–17. <http://doi.org/10.1242/dmm.000471>
- Bharat, T. A. M., Riches, J. D., Kolesnikova, L., Welsch, S., Krahling, V., Davey, N., ... Briggs, J. A. G. (2011). Cryo-Electron Tomography of Marburg Virus Particles and Their Morphogenesis within Infected Cells. *PLoS Biology*, 9(11), e1001196. <http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001196>
- Bhattacharyya, S., Hope, T. J., & Young, J. A. T. (2011). Differential Requirements for Clathrin Endocytic Pathway Components in Cellular Entry by Ebola and Marburg Glycoprotein Pseudovirions. *Virology*, 419(1), 1–9. <http://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8>.Screening
- Bosio, C. M., Aman, M. J., Grogan, C., Hogan, R., Ruthel, G., Negley, D., ... Schmaljohn, A. (2003). Ebola and Marburg Viruses Replicate in Monocyte-Derived

- Dendritic Cells without Inducing the Production of Cytokines and Full Maturation. *The Journal of Infectious Diseases*, 188(11), 1630–1638. <http://doi.org/10.1086/379199>
- Brauburger, K., Hume, A. J., Muhlberger, E., & Olejnik, J. (2012). Forty-five Years of Marburg Virus Research. *Viruses*, 4(10), 1878–1927. <http://doi.org/10.3390/v4101878>
- Cara, I., & Autelli, M. (2014). Marburg hemorrhagic fever. Retrieved September 24, 2016, from <http://flipper.diff.org/app/items/6734>
- Carette, J. E., Raaben, M., Wong, A. C., Herbert, A. S., Obernosterer, G., Mulherkar, N., ... Brummelkamp, T. R. (2012). Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1. *Nature*, 477(7364), 340–343. <http://doi.org/10.1038/nature10348>.Ebola
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). *Viral Hemorrhagic Fevers - Fact Sheet*. CDC Website. Disponível em http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/Fact_Sheets/Viral_Hemorrhagic_Fevers_Fact_Sheet.pdf
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). About Marburg Hemorrhagic Fever. Disponível Setembro 23, 2016, from <http://www.cdc.gov/vhf/marburg/about.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). Marburg hemorrhagic fever (Marburg HF) - Chronology of Marburg Hemorrhagic Fever Outbreaks. Disponível Agosto 25, 2016, em <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/resources/outbreak-table.html#six>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). Marburg hemorrhagic fever (Marburg HF) - Diagnosis. Disponível Setembro 14, 2016, em <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/diagnosis/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). Marburg hemorrhagic fever (Marburg HF) - Marburg Outbreaks 2005-2014. Disponível Setembro 23, 2016, em <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/outbreaks/summaries.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2014). Marburg hemorrhagic fever (Marburg HF) - Transmission. Disponível Setembro 23, 2016, em

<http://www.cdc.gov/vhf/marburg/transmission/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2014). Marburg hemorrhagic fever (Marburg HF) - Treatment. Disponível Setembro 23, 2016, em <https://www.cdc.gov/vhf/marburg/treatment/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (2016). Division of Select Agents and Toxins: What is a Select Agent? Disponível Julho 19, 2016, em <http://www.cdc.gov/phpr/dsat/what-is-select-agents.htm>

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging Zoonotic Infectious Diseases, & Division of High-Consequence Pathogens and Pathology. (2013). Viral Special Pathogens Branch (VSPB). Disponível Julho 20, 2016, de <http://www.cdc.gov/ncezid/dhcpp/vspb/>

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, & Division of High-Consequence Pathogens and Pathology. (2014). Viral Special Pathogens Branch (VSPB): Outbreaks. Disponível Julho 20, 2016, de <http://www.cdc.gov/ncezid/dhcpp/vspb/outbreaks.html>

Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, Division of High-Consequence Pathogens and Pathology, & Viral Special Pathogens Branch. (2014). Marburg Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. Disponível Setembro 20, 2016, de <http://www.cdc.gov/vhf/marburg/outbreaks/uganda/2014-oct.html>

Chandran, K., Sullivan, N. J., Felbor, U., Whelan, S. P., & Cunningham, J. M. (2005). Endosomal Proteolysis of the Ebola Virus Glycoprotein Is Necessary for Infection. *Science*, 308(5728), 1643–1645. <http://doi.org/10.1126/science.1110656>. Endosomal

Chinikar, S., Ghiasi, S. M., Ghalyanchi-Langeroudi, A., Goya, M. M., Shirzadi, M. R., Zeinali, M., & Haeri, A. (2009). An overview of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 1(1), 7–12. Disponível em <http://journals.tums.ac.ir/abs/13435>

ClinicalTrials.gov. (2016a). A Phase 1 Study to Evaluate the Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of BCX4430. Disponível Setembro 23, 2016, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02319772?term=BCX&rank=3>

- ClinicalTrials.gov. (2016b). Evaluation of the Safety and Immunogenicity of Three Consistency Lots and a High-Dose Lot of rVSV-ZEBOV-GP (V920 Ebola Vaccine) in Healthy Adults (V920-012). Disponível Setembro 23, 2016, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02503202?term=rVSV&rank=4>
- ClinicalTrials.gov. (2016c). Immunogenicity of Recombinant Vesicular Stomatitis Vaccine for Ebola-Zaire (rVSV[Delta]G-ZEBOV-GP) for Pre-Exposure Prophylaxis (PREP) in People at Potential Occupational Risk for Ebola Virus Exposure. Disponível Setembro 23, 2016, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02788227?term=rVSV&rank=5>
- ClinicalTrials.gov. (2016d). Partnership for Research on Ebola VACCinations (PREVAC). Disponível Setembro 23, 2016, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02876328?term=rVSV&rank=2>
- ClinicalTrials.gov. (2016e). Phase I Trial to Assess the Safety, Tolerability and Immunogenicity of a Ebola Virus Vaccine (VSVΔG-ZEBOV). Disponível Setembro 23, 2016, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02374385?term=rVSV&rank=7>
- ClinicalTrials.gov. (2016f). Trial to Evaluate Safety and Immunogenicity of an Ebola Zaire Vaccine in Healthy Adults. Disponível Setembro 23, 2016, em <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02718469?term=rVSV&rank=9>
- Cnops, L., Griensven, J. Van, Honko, A. N., Bausch, D. G., Sprecher, A., Hill, C. E., ... Ariën, K. K. (2016). Essentials of filoviral load qualification. *The Lancet*, 16, 134–138. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30063-9](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30063-9)
- Connor, J. H., Yen, J., Caballero, I. S., Garamszegi, S., Malhotra, S., Lin, K., ... Goff, A. J. (2015). Transcriptional Profiling of the Immune Response to Marburg Virus Infection. *Journal of Virology*, 89(19), 9865–74. <http://doi.org/10.1128/JVI.01142-15>
- Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, T. W., Geisbert, J. B., Ströher, U., Hensley, L. E., Grolla, A., ... Jones, S. M. (2006). Cross-Protection against Marburg Virus Strains by Using a Live, Attenuated Recombinant Vaccine. *Journal of Virology*, 80(19), 9659–66. <http://doi.org/10.1128/JVI.00959-06>
- Dicarolo, A., Biedenkopf, N., Hartlieb, B., Klußmeier, A., & Becker, S. (2011).

- Phosphorylation of Marburg Virus NP Region II Modulates Viral RNA Synthesis. *Journal of Infectious Diseases*, 204(Suppl 3), S927–S933. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir319>
- Dolnik, O., Kolesnikova, L., & Becker, S. (2008). Filoviruses: Interactions with the host cell. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(5), 756–776. <http://doi.org/10.1007/s00018-007-7406-2>
- Dolnik, O., Kolesnikova, L., Stevermann, L., & Becker, S. (2010). Tsg101 Is Recruited by a Late Domain of the Nucleocapsid Protein To Support Budding of Marburg Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, 84(15), 7847–7856. <http://doi.org/10.1128/JVI.00476-10>
- Edwards, M. R., Johnson, B., Mire, C. E., Xu, W., Shabman, R. S., Speller, L. N., ... Basler, C. F. (2014). The Marburg virus VP24 protein interacts with Keap1 to activate the cytoprotective antioxidant response pathway. *Cell Reports*, 6(6), 1017–1025. <http://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.043>
- Edwards, M. R., Liu, G., Mire, C. E., Sureshchandra, S., Luthra, P., Yen, B., ... Basler, C. F. (2016). *Differential Regulation of Interferon Responses by Ebola and Marburg Virus VP35 Proteins*. *CellReports* (Vol. 14). Elsevier Ltd. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.049>
- Empig, C. J., & Goldsmith, M. A. (2002). Association of the Caveola Vesicular System with Cellular Entry by Filoviruses. *Journal of Virology*, 76(10), 5266–5270. <http://doi.org/10.1128/JVI.76.10.5266-5270.2002>
- Fauci, A. S. (2014). Ebola - Underscoring the Global Disparities in Health Care Resources. *The New England Journal of Medicine*, 371(12), 1084–6. <http://doi.org/10.1056/NEJMp1409494>
- Federal Select Agent Program. (2014). Select Agents and Toxins List. Disponível Julho 19, 2016, em <http://www.selectagents.gov/SelectAgentsandToxinsList.html>
- Feldman, H., & Geisbert, T. (2011). Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*, 377(9768), 849–862. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60667-8.Ebola](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60667-8.Ebola)
- Feldmann, H., Klenk, H. D., & Sanchez, A. (1993). Molecular biology and evolution of filoviruses. *Archives of Virology*, 7(Suppl), 81–100.

- Feldmann, H., Muhlberger, E., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Sanchez, A., & Klenk, H. D. (1992). Marburg virus, a filovirus: messenger RNAs, gene order, and regulatory elements of the replication cycle. *Virus Research*, 24, 1–19. [http://doi.org/10.1016/0168-1702\(92\)90027-7](http://doi.org/10.1016/0168-1702(92)90027-7)
- Feldmann, H., Slenczka, W., & Klenk, H. D. (1996). Emerging and reemerging of filoviruses. *Archives of Virology*, 11(Suppl), 77–100.
- Feldmann, H., Will, C., Schikore, M., Slenczka, W., & Klenk, H. D. (1991). Glycosylation and Oligomerization of the Spike Protein of Marburg Virus. *Virology*, 182, 353–356. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90680-A](http://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90680-A)
- Fhogartaigh, C. N., & Aarons, E. (2015). Viral haemorrhagic fever. *Clinical Medicine*, 15(1), 61–6.
- Fowler, T., Bamberg, S., Möller, P., Klenk, H. D., Meyer, T. F., Becker, S., & Rudel, T. (2005). Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *Journal of General Virology*, 86, 1181–1188. <http://doi.org/10.1099/vir.0.80622-0>
- Fritz, E. A., Geisbert, J. B., Geisbert, T. W., Hensley, L. E., & Reed, D. S. (2008). Cellular Immune Response to Marburg Virus Infection in Cynomolgus Macaques. *Viral Immunology*, 21(3), 355–363. <http://doi.org/10.1089/vim.2008.0023>
- Funke, C., Becker, S., Dartsch, H., Klenk, H. D., & Muhlberger, E. (1995). Acylation of the Marburg Virus Glycoprotein. *Virology*. <http://doi.org/10.1006/viro.1995.1151>
- Geisbert, T. W., Bailey, M., Geisbert, J. B., Asiedu, C., Roederer, M., Grazia-Pau, M., ... Sullivan, N. J. (2010). Vector Choice Determines Immunogenicity and Potency of Genetic Vaccines against Angola Marburg Virus in Nonhuman Primates. *Journal of Virology*, 84(19), 10386–10394. <http://doi.org/10.1128/JVI.00594-10>
- Geisbert, T. W., Daddario-DiCaprio, K. M., Geisbert, J. B., Young, H. a, Formenty, P., Fritz, E. a, ... Hensley, L. E. (2007). Marburg Virus Angola Infection of Rhesus Macaques: Pathogenesis and Treatment with Recombinant Nematode Anticoagulant Protein c2. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(Suppl 2), S372-81. <http://doi.org/10.1086/520608>
- Geisbert, T. W., & Feldmann, H. (2011). Recombinant Vesicular Stomatitis Virus-Based

- Vaccines Against Ebola and Marburg Virus Infections. *Journal of Infectious Diseases*, 204(SUPPL. 3), 1075–1081. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir349>
- Hartman, A. L., Towner, J. S., & Nichol, S. T. (2010). Ebola and Marburg Hemorrhagic Fever. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1), 161–177. <http://doi.org/10.1016/j.cll.2009.12.001>
- Heald, A. E., Charleston, J. S., Iversen, P. L., Warren, T. K., Saoud, J. B., Al-Ibrahim, M., ... Bavari, S. (2015). AVI-7288 for Marburg Virus in Nonhuman Primates and Humans. *New England Journal of Medicine*, 373(4), 339–348. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1410345>
- Hensley, L. E., Alves, D. A., Geisbert, J. B., Fritz, E. A., Reed, C., Larsen, T., & Geisbert, T. W. (2011). Pathogenesis of Marburg Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques. *Journal of Infectious Diseases*, 204(Suppl 3), 1021–1031. <http://doi.org/10.1093/infdis/jir339>
- Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J., & Schmaljohn, A. (1998). Marburg Virus Vaccines Based upon Alphavirus Replicons Protect Guinea Pigs and Nonhuman Primates. *Virology*, 251, 28–37. <http://doi.org/10.1006/viro.1998.9367>
- Jeffs, B., Roddy, P., Weatherill, D., de la Rosa, O., Dorion, C., Iscla, M., ... Borchert, M. (2007). The Medecins Sans Frontières Intervention in the Marburg Hemorrhagic Fever Epidemic, Uige, Angola, 2005. II. Lessons Learned in the Community. *The Journal of Infectious Diseases*, 196 Suppl(Suppl 2), S162–S167. <http://doi.org/10.1086/520548>
- Johnson, E., Johnson, B., Silverstein, D., Tukei, P., Geisbert, T., Sanchez, A., & Jahrling, P. (1996). Characterization of a new Marburg virus isolate from a 1987 fatal case in Kenya. In T. Schwarz & G. Siegl (Eds.), *Imported Virus Infections* (pp. 101–114). Vienna, Austria: Springer.
- Jouvenet, N., Neil, S. J. D., Zhadina, M., Zang, T., Kratovac, Z., Lee, Y., ... Bieniasz, P. D. (2009). Broad-Spectrum Inhibition of Retroviral and Filoviral Particle Release by Tetherin. *Journal of Virology*, 83(4), 1837–1844. <http://doi.org/10.1128/JVI.02211-08>
- Jun, S. R., Leuze, M. R., Nookaew, I., Uberbacher, E. C., Land, M., Zhang, Q., ... Ussery, D. W. (2015). Ebolavirus comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*,

- 39(5), 764–778. <http://doi.org/10.1093/femsre/fuv031>
- Khan, A. S., Tshioko, F. K., Heymann, D. L., Guenno, B. Le, Nabeth, P., Kerstie, B., ... Ksiazek, T. G. (1999). The Reemergence of Ebola Hemorrhagic Fever , Democratic Republic of the Congo , 1995. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(Suppl 1), S76-86.
- Kiley, M. P. (1988). Filoviridae: Marburg and Ebola Viruses. In *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases Principles and Practice* (pp. 595–601). New York City: Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4612-3900-0_30
- Koehler, A., Kolesnikova, L., Welzel, U., Schudt, G., Herwig, A., & Becker, S. (2016). A Single Amino Acid Change in the Marburg Virus Matrix Protein VP40 Provides a Replicative Advantage in a Species-Specific Manner. *Journal of Virology*, 90(3), 1444–1454. <http://doi.org/10.1128/JVI.02670-15>.Editor
- Koellhoffer, J. F., Malashkevich, V. N., Harrison, J. S., Toro, R., Bhosle, R. C., Chandran, K., ... Lai, J. R. (2012). Crystal Structure of the Marburg Virus GP2 Core Domain in Its Postfusion Conformation. *Biochemistry*, 51(39), 7665–7675. <http://doi.org/10.1021/bi300976m>
- Kolesnikova, L., Bohil, A. B., Cheney, R. E., & Becker, S. (2007). Budding of Marburgvirus is associated with filopodia. *Cellular Microbiology*, 9(4), 939–951. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00842.x>
- Kolesnikova, L., Muhlberger, E., Ryabchikova, E., & Becker, S. (2000). Ultrastructural Organization of Recombinant Marburg Virus Nucleoprotein: Comparison with Marburg Virus Inclusions. *Journal of Virology*, 74(8), 3899–3904. <http://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3899-3904.2000>
- Kugelman, J. R., Sanchez-Lockhart, M., Andersen, K. G., Gire, S., Park, D. J., Sealfon, R., ... Palacios, G. F. (2015). Evaluation of the Potential Impact of Ebola Virus Genomic Drift on the Efficacy of Sequence-Based Candidate Therapeutics. *mBio*, 6(1), e02227-14. <http://doi.org/10.1128/mBio.02227-14>
- Kuhn, J. H., Andersen, K. G., Bào, Y., Bavari, S., Becker, S., Bennett, R. S., ... Nichol, S. T. (2014). Filovirus RefSeq Entries: Evaluation and Selection of Filovirus Type Variants, Type Sequences and Names. *Viruses*, 6(9), 3663–3682. <http://doi.org/10.3390/v6093663>

- Kuhn, J. H., Becker, S., Geisbert, T. W., Johnson, K. M., Nichol, S. T., & Peters, C. J. (2010). Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Archives of Virology*, 155(12), 2083–2103. <http://doi.org/10.1007/s00705-010-0814-x>.Proposal
- Kurosaki, Y., Grolla, A., Fukuma, A., Feldmann, H., & Yasuda, J. (2010). Development and Evaluation of a Simple Assay for Marburg Virus Detection Using a Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2330–2336. <http://doi.org/10.1128/JCM.01224-09>
- Le Guenno, B., Formenty, P., Wyers, M., Gounon, P., Walker, F., & Boesch, C. (1995). Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *The Lancet*, 345(8960), 1271–1274. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90925-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90925-7)
- Leroy, E. M., Gonzalez, J. P., & Baize, S. (2011). Ebola and Marburg haemorrhagic fever viruses: major scientific advances, but a relatively minor public health threat for Africa. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 964–976. <http://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03535.x>
- Lim, J. P., & Gleeson, P. A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology*, 89, 836–843. <http://doi.org/10.1038/icb.2011.20>
- Lin, K. L., Twenhafel, N. A., Connor, J. H., Cashman, K. A., Shamblin, J. D., Donnelly, G. C., ... Goff, A. J. (2015). Temporal Characterization of Marburg Virus Angola Infection following Aerosol Challenge in Rhesus Macaques. *Journal of Virology*, 89(19), 9875–85. <http://doi.org/10.1128/JVI.01147-15>
- Martina, B. E. E., & Osterhaus, A. D. M. E. (2009). “Filoviruses”: a real pandemic threat? *EMBO Molecular Medicine*, 1, 10–18. <http://doi.org/10.1002/emmm.200900005>
- Maruyama, J., Miyamoto, H., Kajihara, M., Ogawa, H., Maeda, K., Sakoda, Y., ... Takada, A. (2014). Characterization of the Envelope Glycoprotein of a Novel Filovirus, Lloviu Virus. *Journal of Virology*, 88(1), 99–109. <http://doi.org/10.1128/JVI.02265-13>
- Matsuno, K., Kishida, N., Usami, K., Igarashi, M., Yoshida, R., Nakayama, E., ... Takada, A. (2010). Different Potential of C-Type Lectin-Mediated Entry between Marburg Virus Strains. *Journal of Virology*, 84(10), 5140–5147.

- <http://doi.org/10.1128/JVI.02021-09>
- Mattila, P. K., & Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 9, 446–454. <http://doi.org/10.1038/nrm2406>
- Mehedi, M., Groseth, A., Feldmann, H., & Ebihara, H. (2011). Clinical aspects of Marburg hemorrhagic fever. *Future Virology*, 6(9), 1091–1106. <http://doi.org/10.2217/fvl.11.79>
- Messaoudi, I., Amarasinghe, G. K., & Basler, C. F. (2015). Filovirus pathogenesis and immune evasion: insights from Ebola virus and Marburg virus. *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), 663–76. <http://doi.org/10.1038/nrmicro3524>
- Miranda, M. E. G., Yoshikawa, Y., Manalo, D. L., Calaor, A. B., Miranda, N. L. J., Cho, F., ... Ksiazek, T. G. (2002). Chronological and Spatial Analysis of the 1996 Ebola Reston Virus Outbreak in a Monkey Breeding Facility in the Philippines. *Experimental Animals*, 51(2), 173–179. <http://doi.org/10.1538/expanim.51.173>
- Miranda, M. E., Ksiazek, T. G., Retuya, T. J., Khan, a S., Sanchez, A., Fulhorst, C. F., ... Peters, C. J. (1999). Epidemiology of Ebola (subtype Reston) Virus in the Philippines, 1996. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(Suppl 1), S115–S119. <http://doi.org/10.1086/514314>
- Modrof, J., Becker, S., & Mühlberger, E. (2003). Ebola Virus Transcription Activator VP30 Is a Zinc-Binding Protein. *Journal of Virology*, 77(5), 3334–3338. <http://doi.org/10.1128/JVI.77.5.3334–3338.2003>
- Moyen, N., Thirion, L., Emmerich, P., Dzia-Lepfoundzou, A., Richet, H., Boehmann, Y., ... de Lamballerie, X. (2015). Risk Factors Associated with Ebola and Marburg Viruses Seroprevalence in Blood Donors in the Republic of Congo. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), e0003833. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003833>
- Mühlberger, E. (2007). Filovirus replication and transcription. *Future Virology*, 2(2), 205–215. <http://doi.org/10.2217/17460794.2.2.205.Filovirus>
- Muhlberger, E., Sanchez, A., Randolph, A., Will, C., Kiley, M. P., Klenk, H. D., & Feldmann, H. (1992). The Nucleotide Sequence of the L Gene of Marburg Virus, a Filovirus: Homologies with Paramyxoviruses and Rhabdoviruses. *Virology*, 187,

- 534–547. [http://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90456-Y](http://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90456-Y)
- Muhlberger, E., Tfering, B. L., Klenk, H.-D., & Becker, S. (1998). Three of the Four Nucleocapsid Proteins of Marburg Virus, NP, VP35, and L, Are Sufficient To Mediate Replication and Transcription of Marburg Virus-Specific Monocistronic Minigenomes. *Journal of Virology*, 72(11), 8756–8764.
- Nakayama, E., Yokoyama, A., Miyamoto, H., Igarashi, M., Kishida, N., Matsuno, K., ... Takada, A. (2010). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Filovirus Species-Specific Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(11), 1723–1728. <http://doi.org/10.1128/CVI.00170-10>
- Negredo, A., Palacios, G., Vázquez-Morón, S., González, F., Dopazo, H., Molero, F., ... Tenorio, A. (2011). Discovery of an Ebolavirus-Like Filovirus in Europe. *PLoS Pathogens*, 7(10), e1002304. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>
- Ng, M., Ndungo, E., Jangra, R. K., Cai, Y., Postnikova, E., Sheli, R., ... Chandran, K. (2014). Cell entry by a novel European filovirus requires host endosomal cysteine proteases and Niemann-Pick C1. *Virology*, 0, 637–646. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.019>.Cell
- Ogawa, H., Miyamoto, H., Ebihara, H., Ito, K., Morikawa, S., Feldmann, H., & Takada, A. (2011). Detection of all known filovirus species by reverse transcription-polymerase chain reaction using a primer set specific for the viral nucleoprotein gene. *Journal of Virological Methods*, 171(1), 310–313. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.11.010>
- Olival, K. J., & Hayman, D. T. S. (2014). Filoviruses in Bats: Current Knowledge and Future Directions. *Viruses*, 6, 1759–1788. <http://doi.org/10.3390/v6041759>
- Pan American Health Organization. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals* (3^a, Vol. III). Disponível em <https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=hqeS2wWgvDIC&pgis=1>
- Peterson, A. T., Lash, R. R., Carroll, D. S., & Johnson, K. M. (2006). Geographic Potential for Outbreaks of Marburg Hemorrhagic Fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(1), 9–15. <http://doi.org/75/1/9> [pii]
- Peterson, A. T., & Samy, A. M. (2016). Geographic potential of disease caused by Ebola

- and Marburg viruses in Africa. *Acta Tropica*, 162, 114–124. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.012>
- Piercy, T. J., Smither, S. J., Steward, J. A., Eastaugh, L., & Lever, M. S. (2010). The survival of filoviruses in liquids, on solid substrates and in a dynamic aerosol. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 1531–1539. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04778.x>
- Pigott, D. M., Golding, N., Mylne, A., Huang, Z., Weiss, D. J., Brady, O. J., ... Hay, S. I. (2015). Mapping the zoonotic niche of Marburg virus disease in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109(6), 366–378. <http://doi.org/10.1093/trstmh/trv024>
- Poch, O., Blumberg, B. M., Bougueleret, L., & Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *Journal of General Virology*, 71, 1153–1162. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-71-5-1153>
- Polonsky, J. A., Wamala, J. F., De Clerck, H., Van Herp, M., Sprecher, A., Porten, K., & Shoemaker, T. (2014). Emerging Filoviral Disease in Uganda: Proposed Explanations and Research Directions. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(5), 790–793. <http://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0374>
- Ramanan, P., Edwards, M. R., Shabman, R. S., Leung, D. W., Endlich-Frazier, A. C., Borek, D. M., ... Amarasinghe, G. K. (2012). Structural basis for Marburg virus VP35-mediated immune evasion mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20661–6. <http://doi.org/10.1073/pnas.1213559109>
- Roberts, J. a, & Andrews, K. (2008). Nonhuman Primate Quarantine: Its Evolution and Practice. *ILAR Journal*, 49(2), 145–156. <http://doi.org/10.1093/ilar.49.2.145>
- Rougeron, V., Feldmann, H., Grard, G., Becker, S., & Leroy, E. M. (2015). Ebola and Marburg haemorrhagic fever. *Journal of Clinical Virology*, 64, 111–119. <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.01.014>
- Sänger, C., Mühlberger, E., Lötfering, B., Klenk, H.-D., & Becker, S. (2002). The Marburg Virus Surface Protein GP Is Phosphorylated at Its Ectodomain. *Virology*, 295, 20–9. <http://doi.org/10.1006/viro.2002.1374>

- Saphire, E. O. (2013). An update on the use of antibodies against the filoviruses. *Immunotherapy*, 5(11), 1221–33. <http://doi.org/10.2217/imt.13.124>
- Sarwar, U. N., Sitar, S., & Ledgerwood, J. E. (2010). Filovirus emergence and vaccine development: A perspective for health care practitioners in travel medicine. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 9, 126–134. <http://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.05.003>
- Schnittler, H.-J., Mahner, F., Drenckhahn, D., Klenk, H.-D., & Feldmann, H. (1993). Replication of Marburg Virus in Human Endothelial Cells: A Possible Mechanism for the Development of Viral Hemorrhagic Disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 91, 1301–1309. <http://doi.org/10.1172/JCI116329>
- Schoggins, J. W. (2014). Interferon-stimulated genes: roles in viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology*, 0, 40–46. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.03.006>. Interferon-stimulated
- Smith, D. H., Isaacson, M., Johnson, K. M., Bagshawe, A., Johnson, B. K., Swanapoel, R., ... Koinange Keruga, W. (1982). Marburg-Virus Disease in Kenya. *The Lancet*, 319(8276), 816–820. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91871-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91871-2)
- Ströher, U., West, E., Bugany, H., Klenk, H. D., Schnittler, H. J., & Feldmann, H. (2001). Infection and Activation of Monocytes by Marburg and Ebola Viruses. *Journal of Virology*, 75(22), 11025–33. <http://doi.org/10.1128/JVI.75.22.11025-11033.2001>
- Swanepoel, R., Smit, S. B., Rollin, P. E., Formenty, P., Leman, P. A., Kemp, A., ... Paweska, J. T. (2007). Studies of Reservoir Hosts for Marburg Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), 1847–1851. <http://doi.org/10.3201/eid1312.071115>
- Swenson, D. L., Wang, D., Luo, M., Warfield, K. L., Woraratanadharm, J., Holman, D. H., ... Pratt, W. D. (2008). Vaccine To Confer to Nonhuman Primates Complete Protection against Multistrain Ebola and Marburg Virus Infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(3), 460–467. <http://doi.org/10.1128/CVI.00431-07>
- Swenson, D. L., Warfield, K. L., Larsen, T., Alves, D. A., Coberley, S. S., & Bavari, S. (2008). Monovalent virus-like particle vaccine protects guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg viruses. *Expert Review of Vaccine*, 7(4), 417–29. <http://doi.org/10.1586/14760584.7.4.417>

- Takada, A. (2012). Filovirus tropism: cellular molecules for viral entry. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1–6. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00034>
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern Recognition Receptors and the Innate Immune Response to Viral Infection. *Viruses*, 3(6), 920–940. <http://doi.org/10.3390/v3060920>
- Timen, A., Koopmans, M. P. G., Vossen, A. C. T. M., Van Doornum, G. J. J., Gunther, S., Van Den Berkmortel, F., ... Coutinho, R. A. (2009). Response to Imported Case of Marburg Hemorrhagic Fever, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), 1171–1175. <http://doi.org/10.3201/eid1508.090051>
- Tomori, O., Bertolli, J., Rollin, P. E., Fleerackers, Y., Guimard, Y., De Roo, A., ... Ksiazek, T. G. (1999). Serologic Survey among Hospital and Health Center Workers during the Ebola Hemorrhagic Fever Outbreak in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *Journal of Infectious Diseases*, 179(Suppl 1), S98–S101. <http://doi.org/10.1086/514307>
- Towner, J. S., Amman, B. R., Sealy, T. K., Reeder Carroll, S. A., Comer, J. A., Kemp, A., ... Rollin, P. E. (2009). Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLoS Pathogens*, 5(7), e1000536. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000536>
- Towner, J. S., Pourrut, X., Albariño, C. G., Nkogue, C. N., Bird, B. H., Grard, G., ... Leroy, E. M. (2007). Marburg Virus Infection Detected in a Common African Bat. *PLoS ONE*, 2(8), e764. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000764>
- Towner, J. S., Sealy, T. K., Khristova, M. L., Albariño, C. G., Conlan, S., Reeder, S. A., ... Nichol, S. T. (2008). Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathogens*, 4(11), e1000212. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212>
- Tukei, P. M. (1988). *Epidemiology and Epizootiological Investigations of Hemorrhagic Fever Viruses in Kenya*.
- U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, & National Institutes of Health. (1999). *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. (J. y. Richmond & R. W. McKinney, Eds.) U.S. Department of Health and Human Services (4th ed.). Washington, DC. <http://doi.org/citeulike-article->

id:3658941

- Urata, S., & Yasuda, J. (2010). Regulation of Marburg virus (MARV) budding by Nedd4.1: A different WW domain of Nedd4.1 is critical for binding to MARV and Ebola virus VP40. *Journal of General Virology*, 91(1), 228–234. <http://doi.org/10.1099/vir.0.015495-0>
- Valmas, C., Grosch, M. N., Schumann, M., Olejnik, J., Martinez, O., Best, S. M., ... Muhlberger, E. (2010). Marburg Virus Evades Interferon Responses by a Mechanism Distinct from Ebola Virus. *PLoS Pathogens*, 6(1). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000721>
- Van Paassen, J., Bauer, M. P., Arbous, M. S., Visser, L. G., Schmidt-Chanasit, J., Schilling, S., ... Van Dissel, J. T. (2012). Acute liver failure, multiorgan failure, cerebral oedema, and activation of proangiogenic and antiangiogenic factors in a case of Marburg haemorrhagic fever. *The Lancet Infectious Diseases*, 12(8), 635–642. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70018-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70018-X)
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Chepurinov, A. A., Blinov, V. M., Dolnik, O., Netesov, S. V., & Feldmann, H. (1999). Characterization of the L gene and 5' trailer region of Ebola virus. *Journal of General Virology*, 80(2), 355–362. <http://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-355>
- Wahl-Jensen, V., Radoshitzky, S. R., de Kok-Mercado, F., Taylor, S. L., Bavari, S., Jahrling, P. B., & Kuhn, J. H. (2013). Role of rodents and bats in human viral hemorrhagic fevers. In S. Singh & D. Ruze (Eds.), *Viral Hemorrhagic Fevers* (pp. 99–127). Boca Raton: Taylor & Francis/CRC Press. <http://doi.org/10.1201/b15172-9>
- Warren, T. K., Warfield, K. L., Wells, J., Enterlein, S., Smith, M., Ruthel, G., ... Bavari, S. (2010). Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of filovirus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2152–2159. <http://doi.org/10.1128/AAC.01315-09>
- Warren, T. K., Warfield, K. L., Wells, J., Swenson, D. L., Donner, K. S., Van Tongeren, S. a, ... Bavari, S. (2010). Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections. *Nature Medicine*, 16(9), 991–994. <http://doi.org/10.1038/nm.2202>

- Warren, T. K., Wells, J., Panchal, R. G., Stuthman, K. S., Garza, N. L., Van Tongeren, S. a, ... Bavari, S. (2014). Protection against filovirus diseases by a novel broad-spectrum nucleoside analogue BCX4430. *Nature*, 508(7496), 402–5. <http://doi.org/10.1038/nature13027>
- Warren, T. K., Whitehouse, C. A., Wells, J., Welch, L., Charleston, J. S., Heald, A., ... Bavari, S. (2016). Delayed Time-to-Treatment of an Antisense Morpholino Oligomer Is Effective against Lethal Marburg Virus Infection in Cynomolgus Macaques. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(2), e0004456. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004456>
- Welsch, S., Kolesnikova, L., Krähling, V., Riches, J. D., Becker, S., & Briggs, J. A. G. (2010). Electron Tomography Reveals the Steps in Filovirus Budding. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000875. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000875>
- Wenigenrath, J., Kolesnikova, L., Hoenen, T., Mittler, E., & Becker, S. (2010). Establishment and application of an infectious virus-like particle system for Marburg virus. *Journal of General Virology*, 91(5), 1325–1334. <http://doi.org/10.1099/vir.0.018226-0>
- Wijesinghe, K. J., & Stahelin, R. V. (2016). Investigation of the Lipid Binding Properties of the Marburg Virus Matrix Protein VP40. *Journal of Virology*, 90(6), 3074–3085. <http://doi.org/10.1128/JVI.02607-15>
- Will, C., Mühlberger, E., Linder, D., Slenczka, W., Klenk, H. D., & Feldmann, H. (1993). Marburg Virus Gene 4 Encodes the Virion Membrane Protein, a Type 1 Transmembrane Glycoprotein. *Journal of Virology*, 67(3), 1203–1210.
- World Health Organization. (2012). Marburg haemorrhagic fever. Disponível Setembro 23, 2016, em http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs_marburg/en/
- World Health Organization. (2014). *Ebola and Marburg virus disease epidemics: preparedness, alert, control, and evaluation*.
- World Health Organization. (2016). Marburg virus disease. Disponível Agosto 31, 2016, from <http://www.who.int/csr/disease/marburg/en/>
- Xue, Q., Zheng, Q. C., Zhang, J. L., Cui, Y. L., & Zhang, H. X. (2014). Exploring the Mechanism How Marburg Virus VP35 Recognizes and Binds dsRNA by Molecular

- Dynamics Simulations and Free Energy Calculations. *Biopolymers*, 101(8), 849–860. <http://doi.org/10.1002/bip.22463>
- Yaddanapudi, K., Palacios, G., Towner, J. S., Chen, I., Sariol, C. A., Nichol, S. T., & Lipkin, W. I. (2006). Implication of a retrovirus-like glycoprotein peptide in the immunopathogenesis of Ebola and Marburg viruses. *The FASEB Journal*, 20, 2519–30. <http://doi.org/10.1096/fj.06-6151com>
- Zaki, S. R., Shieh, W. J., Greer, P. W., Goldsmith, C. S., Ferebee, T., Katshitshi, J., ... Peters, C. J. (1999). A Novel Immunohistochemical Assay for the Detection of Ebola Virus in Skin: Implications for Diagnosis, Spread, and Surveillance of Ebola Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(Suppl 1), S36–S47. <http://doi.org/10.1086/514319>
- Zehender, G., Sorrentino, C., Veo, C., Fiaschi, L., Gioffrè, S., Ebranati, E., ... Galli, M. (2016). Distribution of Marburg virus in Africa: An evolutionary approach. *Infection, Genetics and Evolution*, 44, 8–16. <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.06.014>